ORSAY
N°d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

JEAN-LOUIS MARTIN

INTERACTIONS DANS L'ENVIRONNEMENT DE L'HÈME APRÈS PHOTODISSOCIATION FEMTOSECONDE DES HEMOPROTÉINES LIGANDÉES

SOUTENUE LE 4 JUILLET 1983 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.	M. KARPLUS	Président
	L. LINDQVIST	Rapporteur
	R. BANERJEE	
	M. DUVELLEROY	
	J. JANIN	
	A. ORSZAG	

UNIV.
LIBRARY
MICH.

ORSAY
N°d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

JEAN-LOUIS MARTIN

INTERACTIONS DANS L'ENVIRONNEMENT DE L'HÈME APRÈS PHOTODISSOCIATION FEMTOSECONDE DES HEMOPROTÉINES LIGANDÉES

SOUTENUE LE 4 JUILLET 1983 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.	M. KARPLUS	Président
	L. LINDQVIST	Rapporteur
	R. BANERJEE	
	M. DUVELLEROY	
	J. JANIN	
	A. ORSZAG	

A Joëlle et Sophie,

A mes parents.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique-ENSTA.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur ORSZAG qui a permis à la Biologie de s'exprimer dans son laboratoire.

Sans l'opiniâtreté et le dévouement de A. ANTONETTI, ces recherches en spectroscopie femtoseconde n'auraient pu être. L'expression de mes remerciements ne pourra donc être qu'insuffisante en regard de son rôle dans la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur M. KARPLUS me fait le grand honneur de participer à ce jury. Ses conseils ont eu valeur de guide, ses travaux m'ont révélé le langage de la biologie moderne. Pour sa confiance et son soutien pendant la progression de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur M.F. PERUTZ m'a fait le grand honneur de s'intéresser à ce travail. Ceci a été un encouragement inestimable. Je l'en remercie très vivement.

Monsieur L. LINDQVIST assure le rôle, toujours contraignant, de rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Monsieur R. BANERJEE, Monsieur le Professeur JANIN, ont bien voulu s'intéresser à ce travail et me faire l'honneur de participer à ce jury. Je les prie de trouver ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur le Professeur M. DUVELLEROY est à l'origine de mon travail de recherche. Il a assuré le rôle de formateur et a su communiquer son enthousiasme. Il sait déjà combien je lui en suis reconnaissant. Qu'il me permette de lui renouveler l'expression de toute ma reconnaissance.

Y. LECARPENTIER a bien voulu se fourvoyer dans la même aventure scientifique. Sa présence constante m'a ainsi permis de bénéficier de son soutien sans faille.

Je remercie tout particulièrement A. MIGUS pour son aide efficace et compétente qui a contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie également C. POYART de son aide précieuse et de sa constante collaboration.

Je n'oublierai pas R. ASTIER qui n'a pas hésité à m'accompagner dans de nombreuses " nocturnes " pour la réalisation du système picoseconde Pour son aide précieuse, sa disponibilité, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Les discussions avec D. HULIN et A. MYSYROWICZ ont toujours été très instructives. Je les remercie de m'avoir communiqué quelques bribes de leur savoir.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe " picoseconde " : J.P. CHAMBARET, A. DOS SANTOS, J. ENGLENDER, J. ETCHEPARE, G. GRILLON, J.M. LEMAITRE,

pour leur collaboration et

à G. HAMONIAUX qui a manifesté une grande efficacité dans la réalisation de nombreux éléments du système expérimental.

Mes remerciements s'adresseront enfin aux personnels administratifs du laboratoire pour leur contribution essentielle, et tout particulièrement à Madame A. RODRIGUEZ qui a assuré, avec une constante bonne humeur, la dactylographie de ce manuscrit.

S O M M A I R E

		Page
INTRODUCTION		1
CHAPITRE I :	Structure de l'hème	5
1.1.	Introduction	5
	1.2.1 La Ferroprotoporphyrine IX	5
	1.2.2. La diffraction par rayons X de l'hémoglobine et de la myoglobine	7
	1.2.3. Diffraction de neutrons	11
	1.2.4. Spectroscopie d'absorption X par analyse des structures fines	14
	1.2.5. Modèles théoriques	17
1.3.	Liaison ligand-hème : configuration électronique	21
	1.3.1. Modèles théoriques	21
	1.3.2. Spectroscopie Mössbauer	29
1.4.	La géométrie Fe-ligand	30
1.5.	Affinité et influence de l'histidine distale (E7)	32
1.6.	Rôle de l'histidine proximale (F8) dans le mécanisme de coopérativité	34
1.7.	Le mouvement de l'atome de fer comme mécanisme " trigger ".	35
CHAPITRE II :	Spectroscopie d'absorption résolue dans le temps	38
2.1.	Introduction	38
2.2.	Spectre d'absorption et transitions électroniques du noyau porphyrique	38
	2.2.1. Les modèles théoriques	38
	2.2.2. L'influence de la protéine	41
	2.2.3. La contrainte N_{ε} His(F8)-hème	42

2.3. Spectres de différences hème déligandé - hème ligandé 43

2.3.1. Spectres de différences à l'équilibre 43

2.3.2. Le problème des états excités transitoires 44

2.3.3. Décalage en fréquence et excitation vibrationnelle. 44

2.4. Spectroscopie d'absorption picoseconde 46

2.4.1. Principe. Génération d'un continuum 46

2.4.2 Bilan des données de la littérature 50

2.4.3. L'influence de la longueur d'onde d'excitation. 55

2.4.4. Limite de la résolution temporelle 55

2.5. Intérêt escompté d'une résolution subpicoseconde 55

CHAPITRE III : Le système expérimental 57

3.1. Introduction et historique du montage 57

3.2. La source femtoseconde 59

3.2.1. Le laser en anneau 59

3.2.2. Caractérisation des impulsions par autocorrélation 61

3.3. Amplification des impulsions femtosecondes 64

3.3.1. Configuration et milieux amplificateurs 65

3.3.2. Compensation de la dispersion linéaire compression d'impulsion. 73

3.4. Caractéristiques de la chaîne laser-amplificateur 75

3.5. Spectroscopie femtoseconde 77

3.5.1. Génération d'un continuum-étude théorique 77

3.5.2. La technique excitation-test avec ligne à retard optique. 85

3.6. Excitation accordable sur tout le spectre visible 87

3.7. Systèmes de détection 88
3.7.1. Introduction 88
3.7.2. Mesure de spectres ΔA : 89
l'analyseur optique multicanal.
3.7.3. Mesure des cinétiques : 90
photodiodes et traitement temps réel.

3.8. Performances et limites du système 93
3.8.1. Linéarité dans l'enregistrement des spectres 93
3.8.2. Cinétiques : résolution temporelle 94

CHAPITRE IV : Résultats et discussions 95

4.1 Introduction 95

4.2. Photodissociation des protéines hémiques ligandées avec CO 95
4.2.1. Introduction 95
4.2.2. Préparation des échantillons 96
4.2.3. Résultats 97
4.2.4. Discussion et conclusions 101

4.3. Photolyse et recombinaison de l'oxygène dans la myoglobine 105
4.3.1. Introduction 105
4.3.2. Méthodes 106
4.3.3. Résultats 106
4.3.4. Discussion 109

4.4. Analyse spectrale fine et cinétiques à haute résolution. 114
4.4.1. Introduction 114
4.4.2. Expérimentation et résultats 115

4.5. Spectroscopie femtoseconde des nitrosyl-hémoprotéines 127
4.5.1. Introduction 127
4.5.2. Résultats et discussions 128

CONCLUSION 137

ANNEXE 1 : Traitement des cinétiques 141

BIBLIOGRAPHIE ; 143

ANNEXE 2 : Publications 154

ABREVIATIONS

COMPLEXES - PROTEINES - AMINOACIDES

Hb : hémoglobine

Mb : myoglobine (cachalot ou cheval)

HbO_2, MbO_2 : oxy

HbCO, MbCO : carboxy

HbNO, MbNO : nitrosyl

Hb deox, Mb deox : désoxy

Fe^{2+}, Hb^{2+}, Mb^{2+} : dérivés ferreux

Fe^{3+}, Hb^{3+}, Mb^{3+} : dérivés ferriques, ou oxydés, ou met

Fe^{3+} (protoporph) Cℓ : chloro-hémine

Protohème-CO : Fe^{2+} CO (protoporph) Cℓ

His : histidine

His prox : histidine proximale (F 8)

His dis : histidine distale (E 7)

Im : imidazole

1Me Im : 1- méthyl imidazole

2Me Im : 2- méthyl imidazole

Fe^{II}T piv pp : ferrotétrapivalamidophénylporphyrine

LIGANDS

CO : oxyde de carbone

O_2 : oxygène

NO : oxyde azotique

H_2O : eau

REACTIFS

IHP : inositolhexaphosphate

PEG : polyéthylène-glycol

SYMBOLES

A : absorbance

ΔA : spectre de différence

ε : coefficient d'extinction

λ : longueur d'onde

ϕ : rendement quantique de dissociation

P_{50}: pression partielle (O_2 CO,NO) à 50% de saturation

S : état de spin

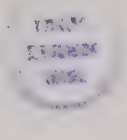
D.O: densité optique

INTRODUCTION

La vie cellulaire repose sur un ensemble de réactions chimiques qui doivent être contrôlées et exécutées de manière extrèmement précise. La connaissance des processus biologiques par l'intermédiaire desquels ces régulations sont réalisées, est essentielle à la compréhension du fonctionnement cellulaire. D'une manière générale, le contrôle de ces réactions passe par une interaction protéine-site actif. Les types de réactions impliquées sont très variés et peuvent avoir comme fonction le " stockage moléculaire ", le transport moléculaire, le transfert électronique ou la catalyse. L'ubiquité des hémoprotéines en fait de très bons candidats pour l'étude des interactions protéine-site actif, c'est-à-dire protéine-hème. Ce fait explique la quantité considérable de travaux tant expérimentaux que théoriques dans le domaine des protéines hémiques.

La structure de ces protéines est maintenant très bien connue grâce, en particulier, aux données de la cristallographie par rayons X (Kendrew 1960-1963, Perutz 1963-1968-1970-1982, Fermi 1975, Takano 1977 a-b, Phillips 1978-1980...). Des informations sur la structure proviennent aussi de travaux de diffraction de neutrons (Norwell 1975) et plus récemment d'expériences d'absorption X par analyse des structures fines (EXAFS) (Eisenberger 1976-1978). Les spectroscopies d'absorption, Raman et Mössbauer,ont aussi produit une quantité considérable d'informations aussi bien à l'équilibre que dans le comportement dynamique de la protéine.

Cependant, l'ensemble des faits expérimentaux résultant de ces différentes investigations, n'ont pas jusqu'ici suffit à construire un modèle du contrôle moléculaire de la réactivité du site actif. Ceci s'explique par le fait que la compréhension de l'interaction protéine-hème — par exemple, le mécanisme de coopérativité dans l'hémoglobine — nécessite la connaissance au niveau atomique du fonctionnement d'une " énorme molécule ".



La réactivité potentielle du site actif ne peut s'exprimer que lors de l'arrivée ou du départ du ligand. Ceci implique que le premier évènement à élucider en dehors de la caractérisation de la liaison hème-ligand, est la nature des transitions impliquées lors de la réalisation ou de la rupture de cette liaison. Cette première modification va induire des changements structuraux localisés à l'hème et à l'environnement protéique proche.

C'est l'objet du présent travail de déterminer, par une discrimination temporelle des évènements, la nature des altérations électroniques et structurales de l'hème, consécutives à la dissociation de la liaison hème-ligand. Les modifications conformationnelles tertiaires et éventuellement quaternaires dans les formes tétramériques en sont par contre exclues. L'influence de la protéine sur le groupe hémique a cependant été abordée par l'analyse comparée des réactions élémentaires dans des composés simples, le protohème (protoporphyrine IX), et celles de deux hémoprotéines : la myoglobine et l'hémoglobine.

Ce travail, essentiellement expérimental, a utilisé la propriété de photodissociabilité de la liaison hème-ligand qui a produit de nombreuses données depuis les travaux de Haldane et Lorrane-Smith(1896)(Antonini 1971, Gibson 1967, Frauenfelder 1978, Eaton 1978, Noe 1978, Alpert 1974, Dudell 1979, Lindqvist 1980, Green 1978, Alberding 1976,. Après photodissociation de la liaison, il est possible de suivre la dynamique de recombinaison du ligand en spectroscopie d'absorption résolue dans le temps par la mesure des spectres de différence hémoprotéine ligandée-hémoprotéine photodissociée. Cette technique de " flash photolyse " a été la première à apporter des informations sur la dynamique d'interaction ligand-protéine avec une résolution submilliseconde (Gibson et Ainsworth 1957, Antonini et Brunori 1971, Sawicki et Gibson 1976). L'utilisation de lasers impulsionnels nanosecondes a ensuite permis de mettre en évidence des cinétiques de recombinaison submicroseconde (Alpert et coll. 1974, Dudell et coll. 1980,Lindqvist et coll. 1980, Lindqvist et coll. 1981). Plus récemment, la spectroscopie picoseconde a révélé la présence d'une phase de recombinaison géminée subnanoseconde (Chernoff et coll. 1980)après dissociation de l'oxyhémoglobine (HbO_2).

En fait, depuis 1978, de nombreux travaux de spectroscopie (d'absorption ou Raman)picoseconde des protéines hémiques ont été publiés (Noe 1978, Greene 1978, Chernoff 1980, Cornelius 1981, Reynolds 1982, Hutchinson 1982, Terner 1981-1982, Nagumo et El Sayed 1981). Ils se sont essentiellement attachés à répondre à quatre questions :

1. Quelle est la cinétique de dissociation ?

2. Quelle est la structure, électronique et conformationnelle, de l'hémoprotéine photolysée immédiatement après la rupture de la liaison hème-ligand ?

3. Comment la nature du ligand affecte-t-elle le schéma de photodissociation ?

4. Quel est le rôle de la structure protéique et hémique dans le processus photolytique ?

Cette profusion de travaux en spectroscopie picoseconde n'a cependant pas réussi à apporter une réponse claire à la plupart de ces questions.

D'une équipe à l'autre, il existe des différences substantielles entre les valeurs de cinétiques de photodissociation et de recombinaison du ligand (ou même la présence ou non d'une phase de recombinaison dans le domaine picoseconde).

Dans l'analyse des causes de cette dispersion dans les données expérimentales, le rôle de la longueur d'onde d'excitation (530 nm, 353 nm ou 265 nm suivant les auteurs) a été évoqué.

Cependant, depuis le travail préliminaire de Shank et coll (1976), il apparaît que les cinétiques de photodissociation des hémoprotéines ligandées doivent être analysées dans le domaine subpicoseconde.

Ce résultat de Shank est très controversé, car en contradiction apparente avec l'ensemble des travaux picosecondes publiés, et de plus n'est pas supporté par une analyse spectrale permettant l'identification du produit de photolyse.

Après ce travail utilisant des impulsions laser de 0.5 ps (0.5×10^{-12} s) de durée, il vient néanmoins à l'esprit qu'une des raisons de l'hétérogénéité des données cinétiques de la littérature pourrait être la conséquence d'une résolution temporelle insuffisante (6 à 25 ps).

Partant de cette idée, nous avons développé une technique de spectroscopie Femtoseconde (Fs)(10^{-15}s) permettant la mesure de spectres d'absorption transitoires après photodissociation du ligand avec une résolution temporelle de 100 Fs(100 x 10^{-15}s).

Tirant parti de cette résolution associée à une possibilité d'analyse spectrale du proche ultraviolet (UV) au proche infra-rouge(IR), nous avons résolu les cinétiques de photodissociation du protohème, de la myoglobine et de l'hémoglobine ligandés avec l'oxyde de carbone(CO), l'oxygène(O_2) ou l'oxyde azotique (NO) . Nous avons ensuite tenté d'interpréter les différentes espèces transitoires résolues, en termes de configuration du noyau porphyrique. La configuration électronique des états intermédiaires est abordée très succintement en utilisant les résultats de Zerner et coll.(1966), Kirchner et Loew(1977), Eaton et coll (1978), sur l'occupation des orbitales, calculée par la méthode de Hückel étendue, ainsi que les résultats des calculs de Case, Gelin et Karplus (1977,1978,1979) par la méthode des modèles X_α et de Pariser-Parr-Pople(PPP).

La nature des changements structuraux de l'hème induits par la photodissociation ainsi que la cinétique des mouvements atomiques dans le domaine Femtoseconde seront discutées avec toute la prudence due aux limites de la spectroscopie d'absorption dans ce débat. Pour étayer notre argumentation, nous évoquerons les résultats récents de la simulation des protéines par la dynamique moléculaire, résultats révélant la présence de mouvements atomiques dans le domaine 200 Fs-10 ps (Karplus et Mc Cammon-1981, Swaminathan et coll. 1982, Ichiye et Karplus 1983).

CHAPITRE 1

1.1. INTRODUCTION

Dans cette partie, nous présenterons la structure du centre actif de la myoglobine ou de l'hémoglobine : la ferroprotoporphyrine IX. Nous verrons la forme isolée que nous avons étudiée, le chloro-hème et rappellerons les différentes données concernant la structure de la poche de l'hème et ses modifications après ligandation. Les géométries des liaisons hème-O_2 et hème-CO seront, à cette occasion,décrites ainsi que la configuration électronique associée que proposent les différents modèles théoriques.

Le rôle de l'histidine distale (N_εHis E7) dans la régulation de l'affinité pour l'oxygène est évoqué à travers l'analyse des résultats de Philipps et coll.(1981), B. Shaanan (1982) et de Kitagawa et coll.(1982).

Sans entrer dans le débat de la présence d'une tension de l'histidine proximale sur l'hème, nous exposerons la proposition de M. Perutz et les données expérimentales qui la supportent.

En conclusion, nous analyserons ce qu'implique la proposition du mouvement de l'atome de fer (Fe^{++}) comme mécanisme déclenchant la coopérativité dans l'hémoglobine.

1.2. STRUCTURE DE L'HEME

1.2.1. La ferroprotoporphyrine IX (F. Koenig 1965)

Le site actif de l'hémoglobine et de la myoglobine , la ferroprotoporphyrine IX, est formé de quatre noyaux pyrroles et d'un atome de fer central.(Fig. 1).

Dans la forme fonctionnelle (ligandée ou non) de l'hémoglobine ou de la myoglobine, le fer reste ferreux (Fe^{2+}). La possibilité d'un transfert de charge dans la liaison Fe-O_2 conduisant à un fer ferrique (Fe^{3+}) sera évoquée plus loin.

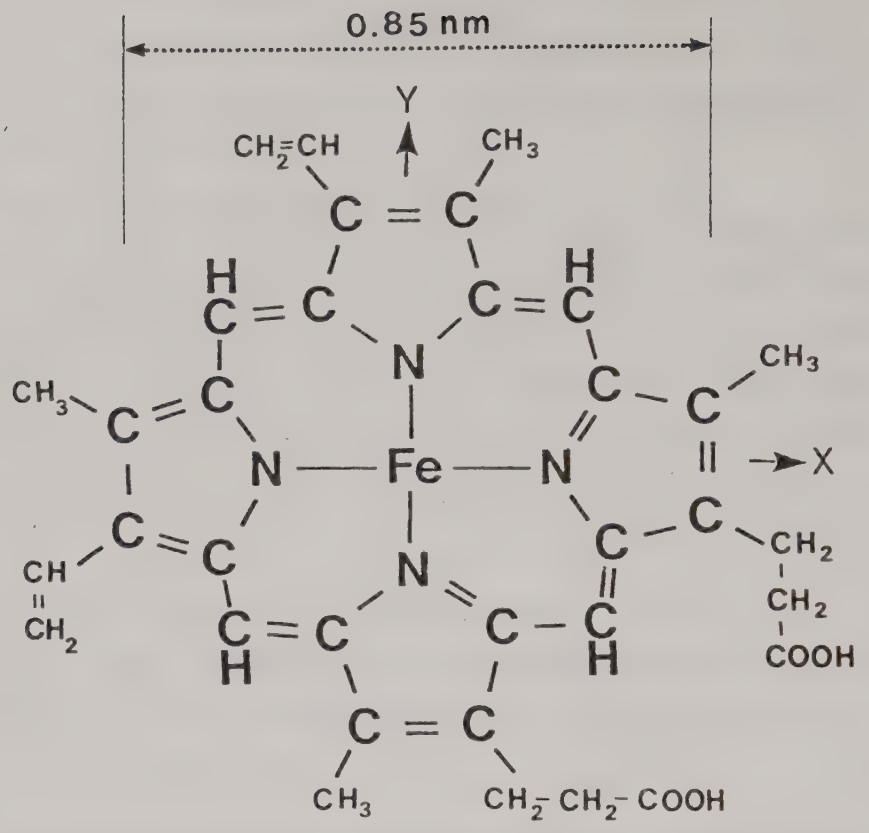


Fig. 1 La ferroprotoporphyrine IX

La région centrale de la molécule sous sa forme chlorohème est donnée Fig. 2 (Koenig 1965). Les données révèlent clairement la position de l'atome de fer au-dessus du plan défini par les 4 atomes d'azote du noyau porphyrique (N porph).

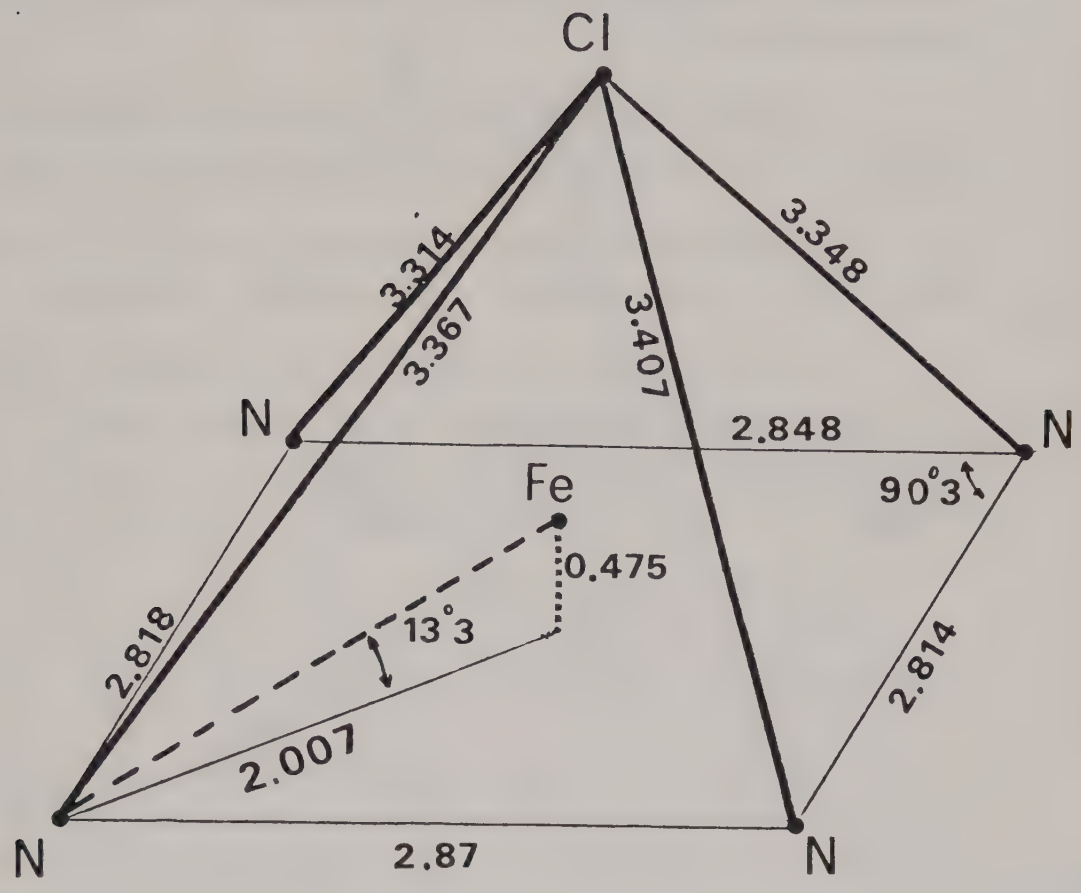


Fig. 2 Structure de la région centrale du chloro-hème

1.2.2. La diffraction par rayons X de l'hémoglobine et de la myoglobine

Les structures tri-dimensionnelles de la myoglobine et de l'hémoglobine ont été déterminées par diffraction rayons X (Kendrew 1960, 1963; Perutz 1963,1968,1970).

Nous ne présentons pas ici la structure complète de ces protéines, par contre nous analyserons la structure de l'hème et de son environnement proche qui sera un guide précieux dans l'interprêtation de nos résultats.

Dans la myoglobine et l'hémoglobine, l'hème est lié à la globine par : i) une liaison covalente entre l'atome de fer et l'azote N_ε de l'histidine proximale (His F 8). ii) des ponts hydrogènes à partir des chaines

propioniques hydrophiles accessibles au milieu extérieur, à savoir, le groupe propionique III avec l'arginine CD 3 (Arg CD3), l'autre propionique hydrophile pointe vers l'histidine F G2(His F G2) et la glutamine H5(Gln H5).

Il existe par ailleurs, 80 interactions non-polaires avec 27 atomes de la globine qui sont à une distance inférieure à 4 Å.

La position du ligand par rapport au fer et à l'histidine distale (His E7) sera présentée plus loin dans ce chapitre.

Les conformations des groupes propioniques sont très dépendantes de la forme ligandée ou déligandée et varient des chaînes α aux chaînes β. Par exemple, dans les chaînes β de l'hémoglobine, la sérine en position CD3 est trop courte pour permettre la réalisation d'un pont hydrogène.

Sans entrer dans le détail, nous retiendrons que :

i) l'hème et son environnement dans les sous-unités α sont plus proches de la structure de l'hème de la myoglobine que ne le sont les hèmes β.

ii) l'atome de fer est très proche du plan de la porphyrine dans la forme met-hémoglobine (Met Hb) ou oxyhémoglobine(HbO_2)(ou Met Mb et MbO_2) avec comme valeurs pour la distance Ct-Fe(Å) (voir Fig.3) :

HbO_2(sous-unité α) : 0.13 Å

HbO_2(sous-unité β) :-0.08 Å

MbO_2 : 0.18

(d'après B. Shaanan, 1982)

La position du fer en situation déligandée a été le sujet de de nombreuses controverses.

Pour Perutz (1970,1979,1982), les données de la cristallographie par rayons X sont irréfutables et révèlent, pour les deoxy-hémoprotéines, la présence d'une géométrie du noyau porphyrique en forme de dôme, le fer étant en dehors du plan de l'hème. Cette proposition, contestée par d'autres travaux (Eisenberg,1978), a cependant été, sans ambiguité, démontrée dans un travail récent de Perutz et coll.(1982). Cette proposition est aussi

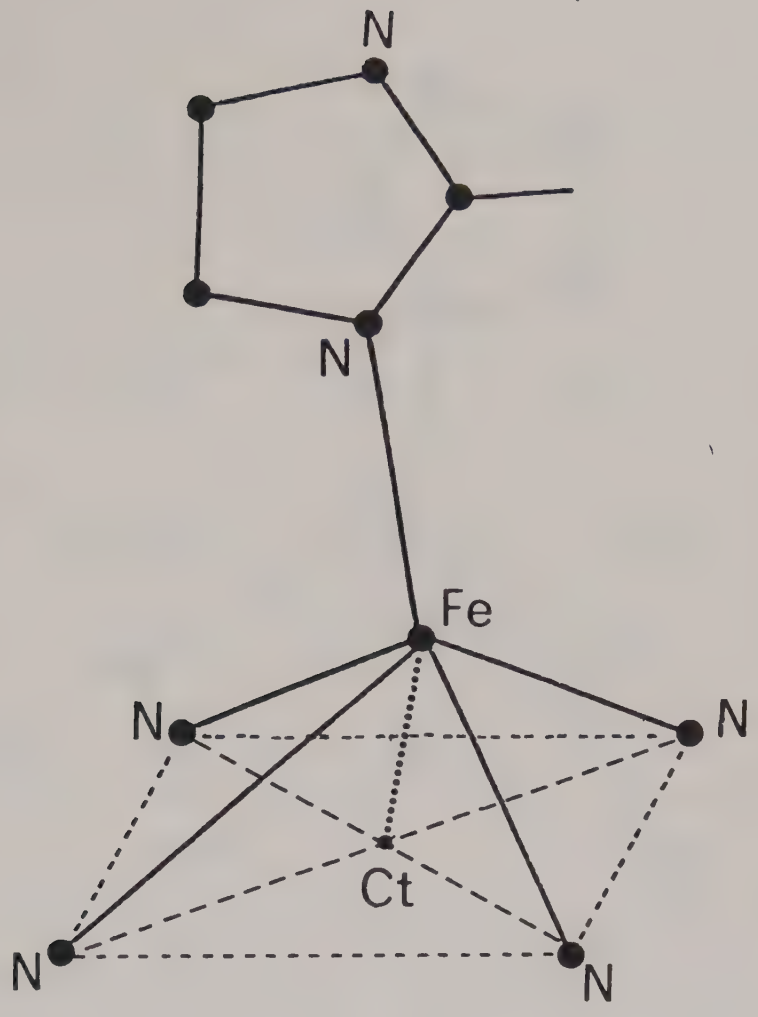
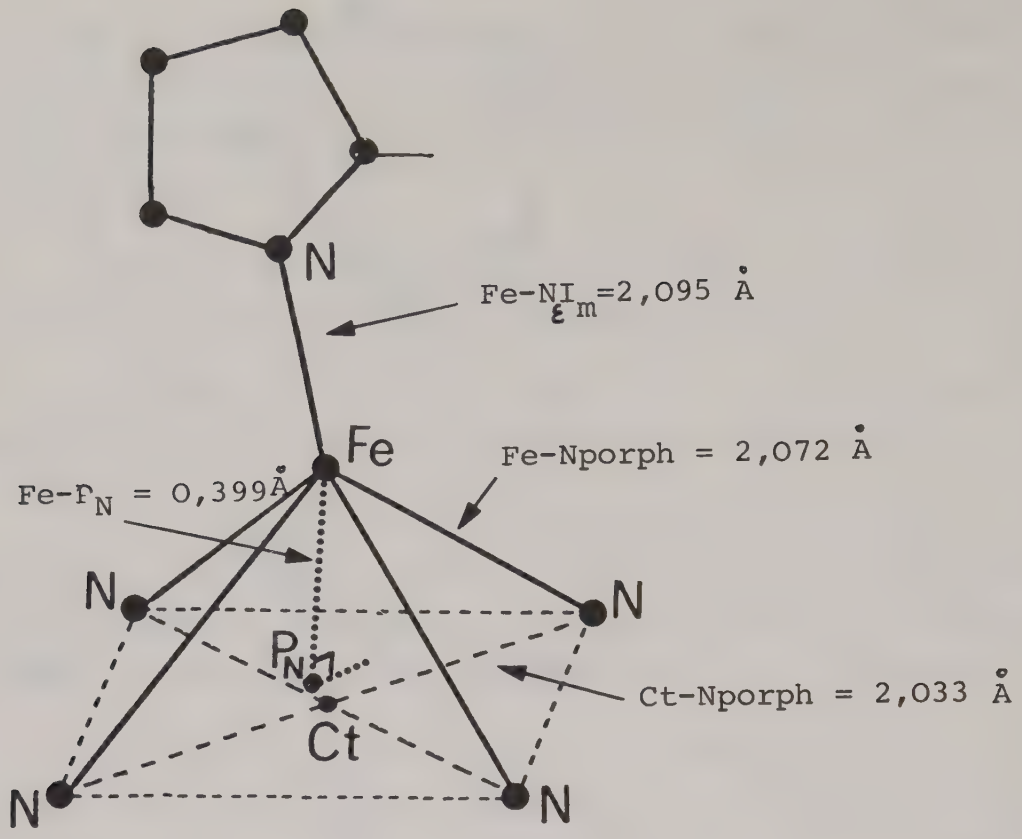


Fig. 3 Distance Ct-Fe (définition)(valeur positive au-dessus du plan)

en accord avec les résultats de modèles théoriques (voir § 1.3.1). Perutz et coll. ont, dans ce travail, systématiquement déterminé par cristallographie aux rayons X à haute résolution, les coordonnées des ferroporphyrines et des ferriporphyrines en structure monocristalline avec Fe^{2ou3+} 5 fois lié. Ils trouvent invariablement l'atome de fer au-dessus du plan de l'hème avec des valeurs pour la distance $Fe-P_{CN}$ comprises entre 0.392 Å et 0.537 Å (voir définition figure 4). Le complexe synthétique " Picket Fence " est une illustration très démonstrative (Fig. 4) de ces résultats.



PN : Plan défini par les 4 atomes d'azote (N porph)

P_{CN}: " " " les atomes d'azote et de carbone (C porph)

Fig. 4 Stéréochimie des liaisons du fer en forme deox dans le complexe synthétique " Picket Fence "

Dans ce modèle simple, la valeur Fe-P_N a été déterminée à $\pm$ 0.004 Å (erreur standard). Dans le cas de la deoxyhémoglobine, les cartes de densité électronique à 2.5 Å de résolution, ont permis d'évaluer les positions des atomes de Fer à $\pm$ 0.05 Å . En ajustant un modèle plan de protoporphyrine IX à cette carte, la position des atomes N porph et C porph a été déterminée à 0.14 Å près. Les différentes données pour HbO_2, Hb, "Picket Fence " sont présentées tableau 1 :

	Fe-N porph	$Fe-N_{\varepsilon}$	Fe-PN	$Fe\ P_{CN}$
Hb α	2.07	2.12	0.40	0.58
Hb β	2.07	2.12	0.36	0.49
Fe II T piv PP (Picket-Fence)	2.072	2.095	0.399	0.505
HbO_2 α	1.99	1.94	0.12	0.16
HbO_2 β	1.96	2.07	-0.11	0.00
$Fe-O_2$T piv PP 2 Me Im	1.996	2.107	-0.086	

Tableau 1 D'après Perutz 1979-1982, Fermi 1977, Jameson 1980

En conclusion, les données de la cristallographie rayons X, révèlent, sans équivoque possible compte-tenu de la précision affichée, que lors de la déligandation l'atome de fer initialement dans le plan de l'hème, s'en écarte en direction de l'atome N_{ε} (His F 8).

Ce mouvement de l'atome de Fer n'affecte pas d'une manière importante la distance $Fe-N_{\varepsilon}$:

$\Delta(Fe-N_{\varepsilon})_{\alpha} = -0.18$ Å et $\Delta(Fe-N_{\varepsilon})_{\beta} = -0.05$ Å dans la réaction

$HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$.

1.2.3. Diffraction de neutrons

La cristallographie rayons X des protéines ne permet pas de révéler la présence de ponts hydrogènes. Les rayons X sont, en effet, très peu diffusés par les atomes d'hydrogène ce qui ne permet pas de les repérer sur les cartes de densité électronique. Comme on le verra § 1.5, le rôle de ponts hydrogènes est suspecté dans la stabilisation de la fixation de l'oxygène. Il est donc primodial de pouvoir distinguer un simple contact de type Van der Waals de l'existence d'un pont hydrogène.

Les neutrons, aussi efficacement diffusés par les atomes d'hydrogène que par les atomes Fe, N, C, O ou S, permettent de distinguer très nettement la présence d'atomes d'hydrogène.

Les premiers travaux, révélant par diffraction de neutrons la présence d'atomes d'hydrogène (H)(ou de deutérium (D) dans le cas de l'échange H/D) , ont été réalisés par Schoenborn (1969). Les données pour la MetMb ont été publiées par ce même auteur en 1971 et pour MbCO en 1975 par Norvell et coll. Récemment, Hanson et Schoenborn (1981)en affinant le traitement des données de la diffraction de neutrons, ont particulièrement étudié la structure des molécules d'eau liées à la protéine et à la structure de la poche de l'hème dans MbCO. La comparaison de leurs résultats avec ceux données par la diffraction de rayons X (Watson 1969, Takano 1977) s'avère difficile, le pH, les ligands, les conditions de cristallisation et les méthodes de traitement étant différentes. Ce travail de Hanson et Schoenborn a montré le rôle des atomes d'hydrogène dans la stabilisation de l'environnement de l'hème.

L'acide propionique du noyau pyrrole IV (voir. fig.5) réalise un pont hydrogène avec l'histidine His 97 FG 2 et éventuellement avec la sérine Ser 92 F 7. Le groupe propionique III pointe l'arginine Arg 45 CD3 sans toutefois réaliser un pont hydrogène, une molécule d'eau s'intercalant.

L'histidine proximale (His F 8) forme un pont hydrogène avec le peptide F 4(distance H_{δ_1} - groupe carbonyle = 2.22 Å). Le ligand et l'azote N_{ε_2} de l'histidine distale (His E 7) peuvent,dans certaines conditions,réaliser un pont hydrogène (§ 1.5).

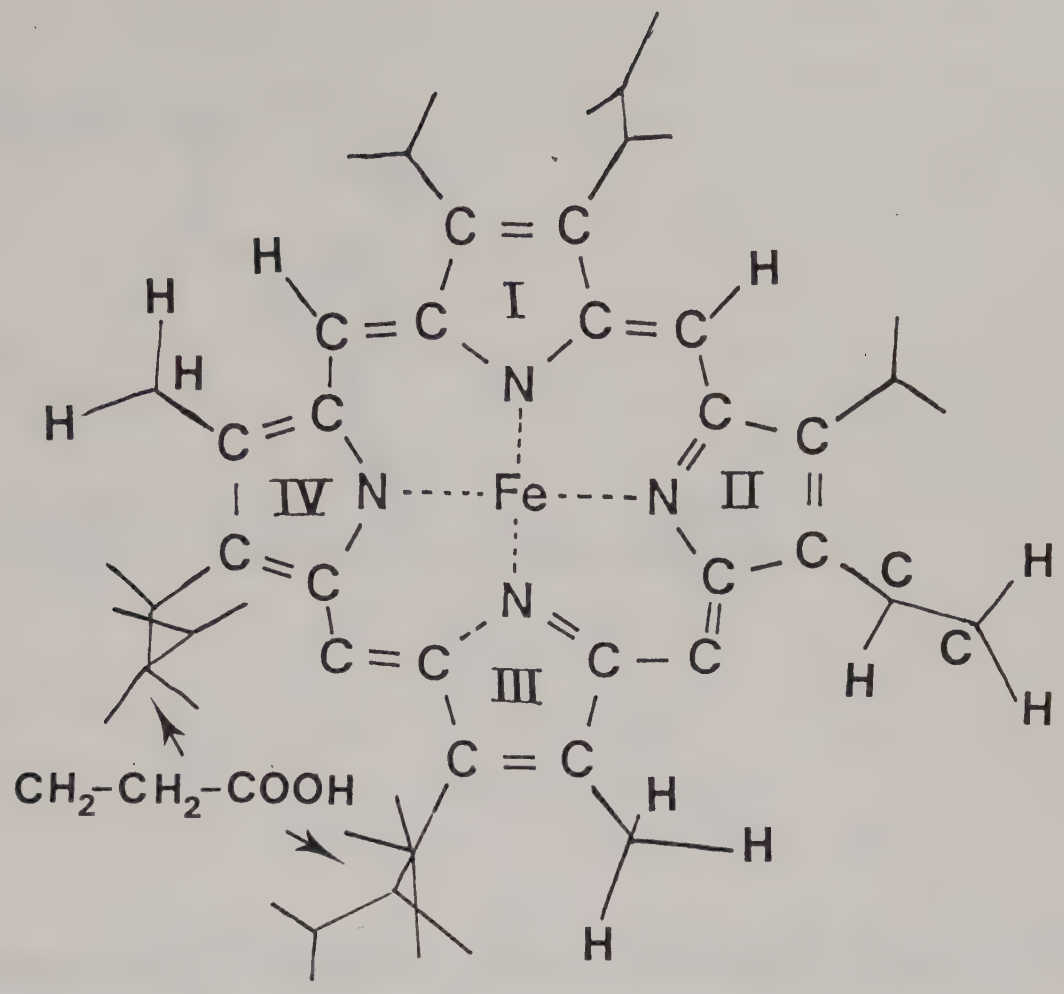


Fig. 5 L'hème vu à la"verticale" du Fer du côté de l'histidine distale (Noter la position des 2 groupes propioniques).

Du côté de l'histidine proximale (His F8), la géométrie donnée par la diffraction de neutron pour MbCO est représentée Fig. 6. Remarquer, d'autre part, la forme linéaire de la liaison Fe-C-O.

Dans MbO_2, les travaux de Phillips et B.P. Schoenborn (1981) ont conforté l'idée d'une liaison $Fe-O_1-O_2$ non linéaire et mis en évidence la présence d'un pont hydrogène O_2-histidine distale (§ 1.5).

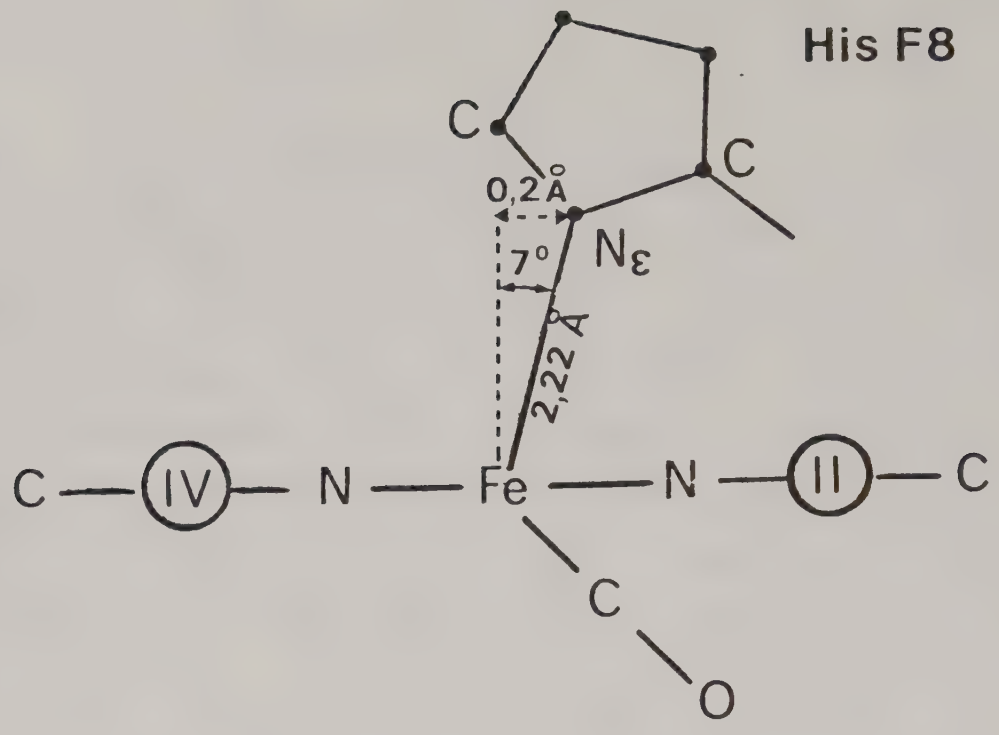


Fig 6 Diffraction de neutrons : géométrie de la liaison Fe-His F 8 dans MbCO.

1.2.4. Spectroscopie d'absorption X par analyse des structures fines (EXAFS)

L'utilisation du rayonnement X synchrotron accordable en énergie, a rendu possible la détection des structures fines dans le spectre d'absorption X d'une solution diluée de métalloprotéines. L'obtention de spectres pour l'hémoglobine avec un bon rapport signal/bruit a nécessité la mise au point d'une nouvelle technique permettant de mesurer la fluorescence du rayonnement X absorbé au lieu de la transition directe (Eisenberger et coll. 1976). La mesure est réalisée en ajustant l'énergie des RX à la valeur du seuil de la bande K de l'atome de fer. Le principe de la mesure est que pour des énergies juste supérieures à la valeur du seuil de bande d'absorption X, l'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à l'absorption. L'avantage de cette méthode pour l'étude d'atomes en solution diluée est que l'on mesure la seule contribution de l'atome qui nous intéresse (la fluorescence Fe-K_α ne se produit que lors de l'absorption d'un photon X par l'atome de fer) alors que l'absorption d'autres atomes est 100 fois supérieure dans l'hémoglobine.

En absorption ou en fluorescence X, l'information sur la structure au voisinage de l'atome de fer doit être extraite de l'analyse de la modulation au-dessus du seuil de la bande K. Cette modulation dépend de la structure de l'environnement proche du fer en étant proportionnelle à :

$$\sum_i \frac{n_i}{kRi^2} e^{-Ri/\lambda} f(k, \pi) e^{-2\sigma i^2 k^2} \sin [2kRi+\alpha(k)]$$

avec n_i atomes voisins dans l'espace i à la distance R_i du fer. Pour l'hémoglobine, dans la somme des contributions, sont inclus, les 4 N porph, les 8 C porph les plus proches, les carbones des noyaux pyrroles ainsi que les atomes au-dessus ou au-dessous du plan de l'hème et proches du fer. Dans la formule précédente k est le vecteur d'onde

$$k = 2 M(E-E_E)/ \hbar^2$$

avec $(E-E_E)$ excès d'énergie et M masse effective .

σ_i = fluctuation moyenne de R_i

$\alpha(k)$ = fonction de déphasage

Le passage de l'espace des k à l'espace des réels (distances du réseau) n'est pas trivial. Il nécessite de nombreuses hypothèses et la connaissance des distances Fe-N et Fe-C dans d'autres composés simples pour lesquels il a été établi les lois $\Delta k = g(R)$ (Δk : différence entre 2 maxima de la modulation).

Les modèles utilisés par Eisenberger et coll.(1976) donnent les relations suivantes :

$$\alpha = \alpha_o + 0.84\ k$$

$$R = \pi/\Delta k - 1/2\ d\alpha/dk$$

Avec cette méthodologie, ces auteurs ont déterminé les distances Fe-N porph dans les formes oxy et deoxy de l'hémoglobine et du complexe synthétique " Picket Fence " (PF)(tableau 2).

	distances Fe-N porph (Å)
PF O_2	1.979 ± 0.01
HbO_2	1.986 ± 0.01
PF	2.055 ± 0.003
Hb	2.055 ± 0.002

Tableau 2 Distances Fe- N porph déterminées par EXAFS (d'après Eisenberger 1978).

Les résultats de la forme deox ont été confirmés par Perutz et coll.(1982).

A partir de ces données, Eisenberger et coll.(1978) ont donné une valeur pour la distance du fer par rapport au plan de l'hème : Fe-PN = $0.2 \begin{smallmatrix} + 0.1 \\ - 0.2 \end{smallmatrix}$ Å pour Hb.

Ce résultat a été la source d'une sévère controverse entre ces deux auteurs, le déplacement de l'atome de fer étant la première étape de l'interaction hème-hème dans le modèle de Perutz. Ce dernier a refait les expériences de Eisenberger dans les mêmes conditions, en associant en plus les données de la cristallographie X. Il a ainsi démontré que la méthode par triangulation utilisée par Eisenberger était inappropriée pour déterminer $Fe-P_N$.

Eisenberger avait utilisé le schéma et les valeurs suivantes (avec Ct-N porph d'après Hopfield 1973)(Fig. 7).

Le problème est que Ct-N porph n'est pas invariant pour les hèmes 5 fois coordonnés, et que la valeur $Fe-P_N$ donnée par cette méthode est très sensible à la valeur de Ct-N porph : $\delta(Fe-P_N)/\delta(Ct-N\ porph) = 5$.

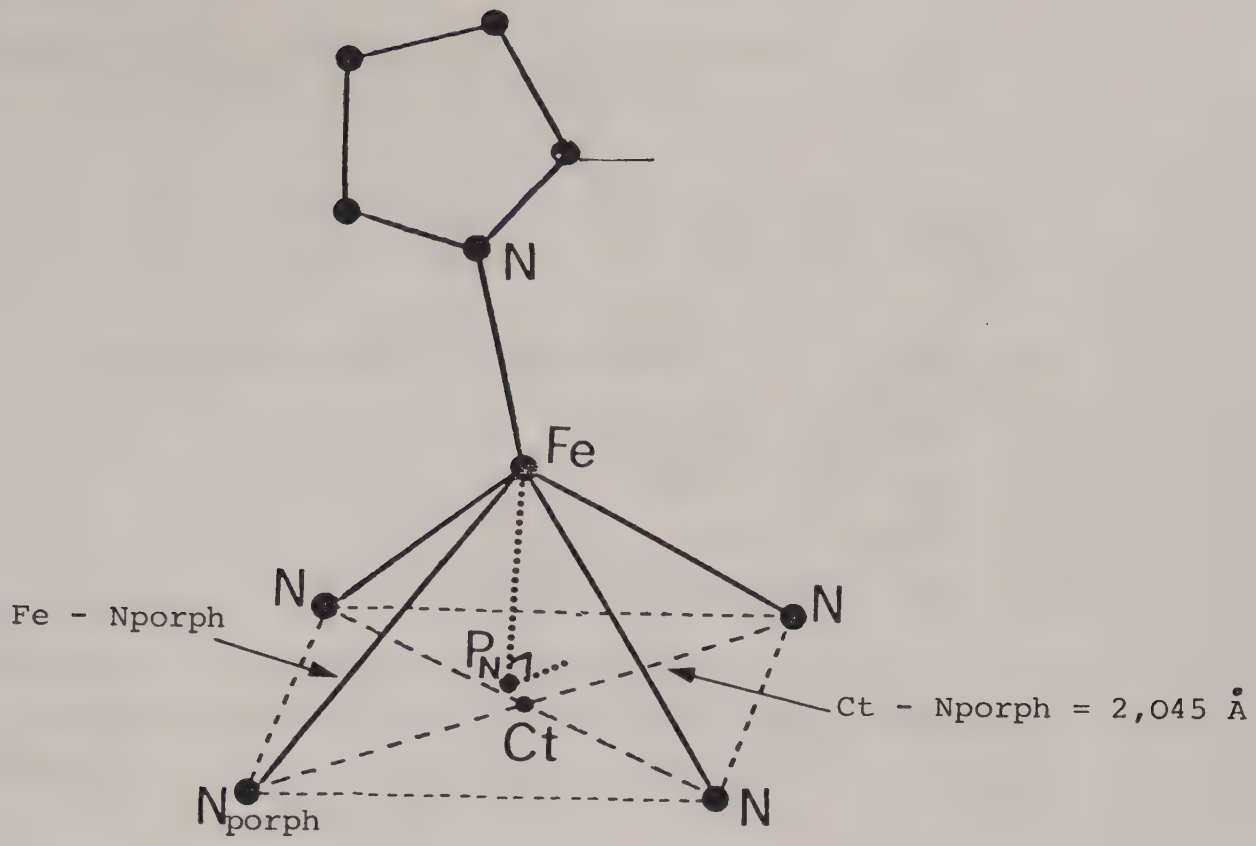


Fig 7 Triangulation pour déterminer $Fe-P_N$

$$Fe-P_N = \sqrt{2.055^2-2.045^2} = 0.2 \text{ Å}$$

1.2.5. Modèles théoriques

Le comportement dynamique de la structure de l'hème n'a pu être jusqu'ici révélé par la diffraction X ou toute autre technique.

L'analyse dynamique est pourtant primordiale, la diffraction X ayant montré une structure qui, si elle était rigide, ne permettrait pas au ligand d'accéder à l'intérieur de la " poche " de l'hème (Perutz et Matthews, 1966; Takano, 1977 a,b).

Seule la théorie, par l'intermédiaire de la dynamique moléculaire peut, à l'heure actuelle, nous apporter des informations sur les fluctuations de structure de la protéine et sur le mouvement du ligand dans la matrice protéique. Une analyse théorique d'un modèle simplifié du système myoglobine-ligand a été réalisée par Case et Karplus(1979). L'énergie conformationnelle totale de la protéine est exprimée par :

$$E = \sum_{\text{liaisons}} \frac{1}{2} Kb(b-b_o)^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{1}{2} K_\theta(\theta-\theta_o)^2 + \sum_{\text{dièdres}} \frac{1}{2} K_\varphi \cos(n\Phi + S)$$

$$+ \sum_{\substack{\text{paires} \\ \text{non liées}}} \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_A q_B}{\varepsilon_r} + \sum_{\substack{\text{ponts} \\ \text{hydrogènes}}} \frac{C}{r^{12}} - \frac{D}{r^{10}}$$

avec : A,B,C,D paramètres ajustés (Gelin et Karplus 1979)

b longueur de la liaison

θ angle de la liaison

Φ angle de torsion

r distance inter-atomes non liés

Dans ce calcul, seuls les atomes lourds sont traités, les atomes d'hydrogène entrant comme facteur correctif(ainsi les carbones de groupes méthyles possèdent un rayon de 1.9 Å au lieu de 1.7 Å). La simulation de la myoglobine comprend ainsi 1261 atomes lourds.

L'énergie d'interaction protéine-ligand est simulée en modélisant un ligand diatomique par une sphère neutre, ce qui permet d'utiliser la formulation de Lennard-Jones :

$$V = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6}$$

Le diamètre de la sphère simulant la molécule O_2 ou CO est de 3.2 Å (valeur volontairement inférieure au diamètre effectif $\sim$ 4.4 Å) pour l'établissement de la carte en énergie. Pour le calcul des trajectoires, le diamètre est supposé plus faible : 2.8 Å .

La carte des niveaux dans l'environnement de l'hème est donnée Fig. 8. Deux trajectoires typiques du ligand après photodissociation sont superposées. L'atome de fer est l'origine des coordonnées. Cette figure est une projection sur un plan x, y parallèle au plan de l'hème et à z = + 3.2 Å (z positif côté de l'histidine E 7). Les points de la trajectoire du ligand représentent des intervalles de temps de 0.15 ps.

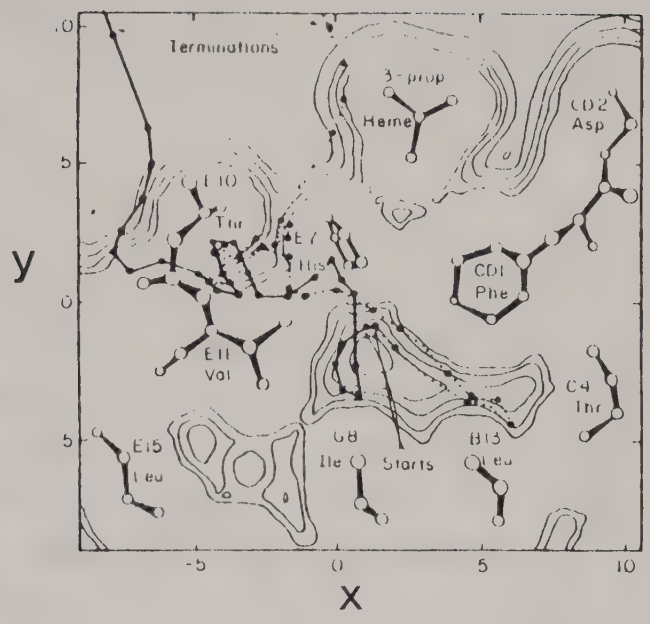


Fig. 8 Carte des niveaux d'énergie dans l'environnement de l'hème de la myoglobine. Les courbes isoénergétiques sont à 90, 45, 10,0 et 3 k cal/mol par rapport à un ligand à l'infini (les valeurs les plus grandes sont les plus proches des atomes). (D'après Case et Karplus 1979).

En résumé, d'après ce travail de Case et Karplus, 65% des trajectoires aboutissent à un ligand piégé dans la poche de l'hème, 20% des ligands s'échappent en empruntant un chemin entre E 7 et E 11, 15% en passant par l'hélice B en direction du pyrrole II.

Ce dernier passage est beaucoup moins fréquent pour les chaines α de l'hémoglobine.

D'autre part, il faut retenir que la dynamique de diffusion du ligand intervient dans le domaine picoseconde et subpicoseconde.

Ces résultats peuvent aussi être analysés en termes de barrières énergétiques et sont ainsi à comparer aux données expérimentales du groupe Frauenfelder (Austin et coll.,1975; Alberding et coll.,1976, 1978; Doster et coll., 1982,Alben et coll.,1982) et au modèle qu'il propose comportant 2 barrières (Fig. 9).

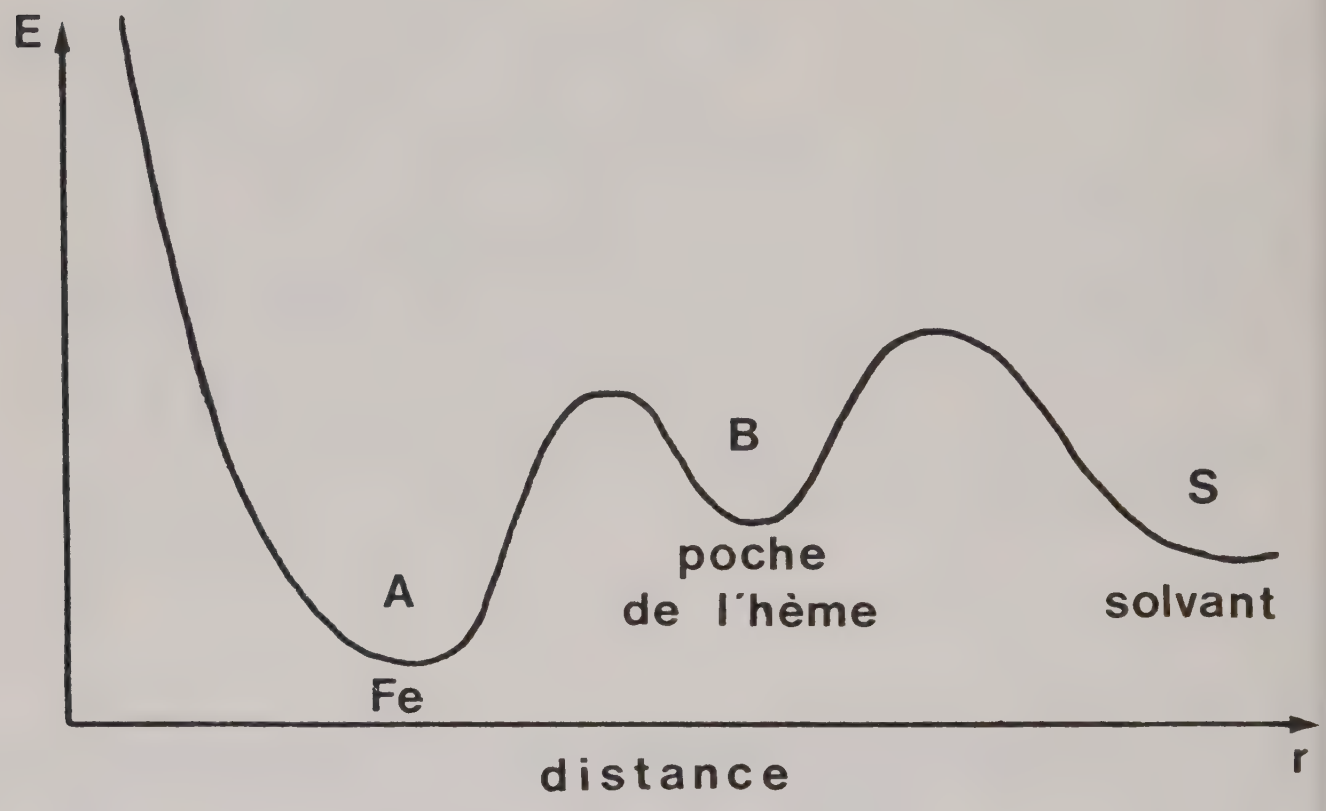


Fig. 9 Barrières d'énergie vues par le ligand (d'après Austin et coll 1975).

Ce modèle à 2 barrières a son correspondant dans la trajectoire dite " classique " (E 7 - E 11) proposée par Case et Karplus. Ces derniers leur attribuent une valeur de 6 k cal/mol (H_{B-S}) et de 13 k cal/mol(H_{A-B}).

1.3. LIAISON LIGAND-HEME : CONFIGURATION ELECTRONIQUE

1.3.1. Modèles théoriques

La structure électronique de la liaison hème-ligand relève de la mécanique quantique.

La complexité de ce système multi-atomique a nécessité, pour sa modélisation, l'introduction d'approximations dans le calcul des orbitales moléculaires.

La nature des approximations dans les calculs et le type de simplifications dans la description du système porphyrine-ligand, déterminent une méthode. Les plus usuellement utilisées sont la méthode de Pariser-Parr-Pople(PPP), la méthode de Hückel étendue et la méthode de diffusion multiple X_α. Il n'est pas de l'objet de ce travail d'examiner les détails des calculs. Partant des orbitales atomiques, nous allons donner les caractéristiques des principales orbitales moléculaires impliquées dans le processus photolytique et nécessaires à l'analyse des spectres transitoires.

Les calculs de mécanique quantique doivent être précédés par un modèle géométrique du complexe hème-O_2.

Nous donnons à titre d'exemple, la géométrie utilisée par Case, Huynh et Karplus(1979) (Fig. 10).

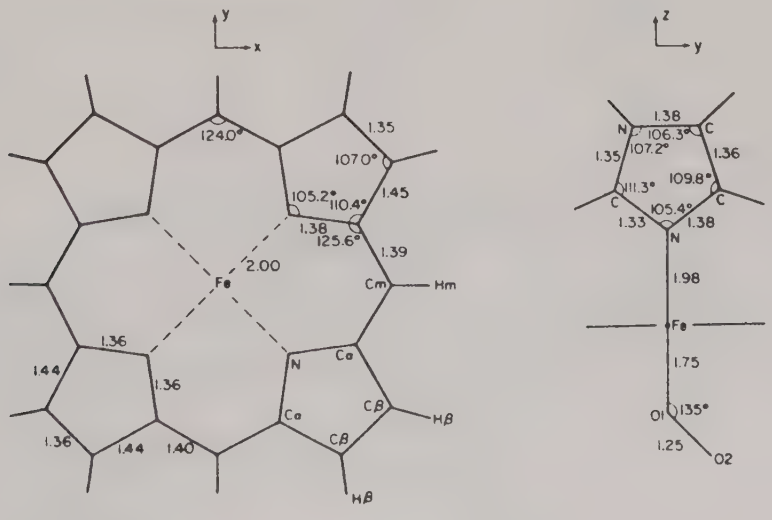


Fig 10 Géométrie supposée du complexe hème-O_2 (distances en Å)

Il faut noter que la position des axes x, y, z n'est pas celle usuellement utilisée et qu'il conviendra de réaliser des permutations dans le libellé des orbitales d'un auteur à l'autre.

Dans les travaux utilisant un système de coordonnées tel que les axes x, y interceptent les atomes N porph, il conviendra d'introduire les correspondances suivantes pour les orbitales d :

axes x,y suivant N porph	axes x, y 45° N porph
$d\ x^2 - y^2$	$d\ x\ y$
$d\ x\ y$	$dx^2 - y^2$

La modélisation du complexe hème-ligand doit comporter l'orbitale 1 s de l'hydrogène, les orbitales 2 s et 2 p du carbone, de l'azote et de l'oxygène et les orbitales 3 d, 4 s, et 4 p du fer. Ce qui donne 149 orbitales atomiques et 158 électrons. En fait, la plupart des travaux ne tiennent compte que des orbitales les plus importantes, à savoir, les orbitales 3 d, 4 s et 4 p du fer, les orbitales 2 s et 2 p de l'oxygène et du carbone, et les orbitales moléculaires π de la porphyrine et de l'imidazole de l'histidine proximale F 8.

Les orbitales atomiques du fer sont données Fig. 11 :

(Fe : $1s^2\ \ 2s^2\ \ 2p^6\ \ 3s^2\ \ 3p^6\ \ 4s^2\ \ 3d^6$)

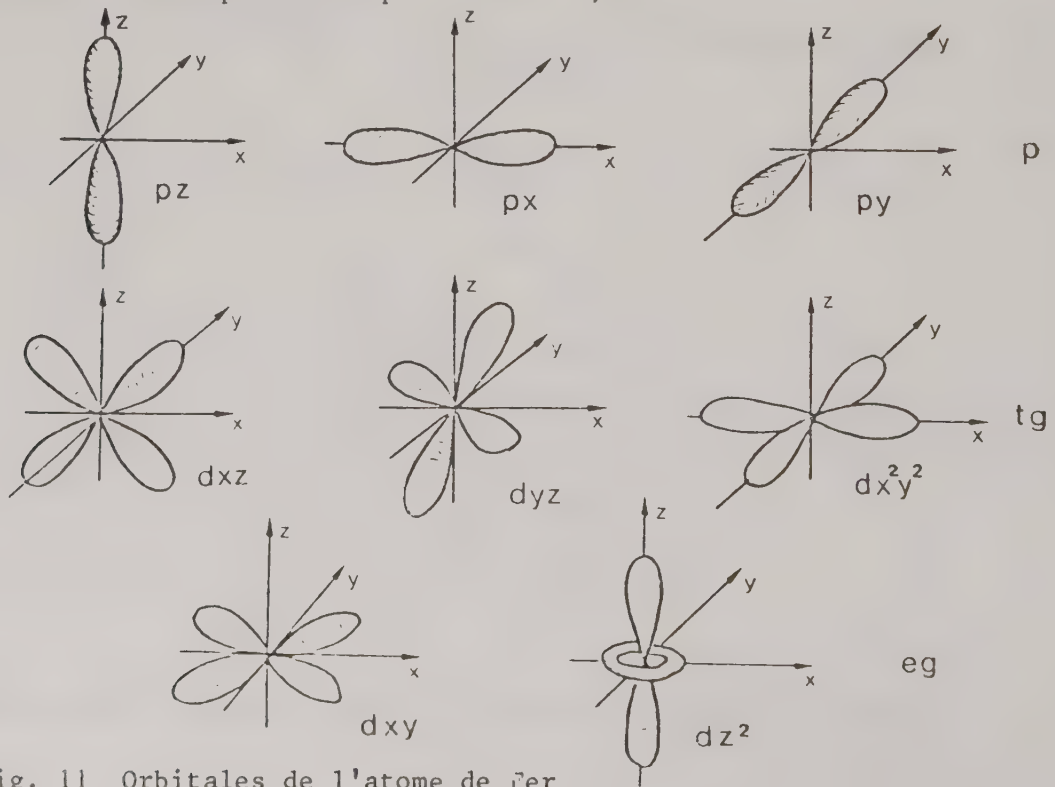


Fig. 11 Orbitales de l'atome de fer

La configuration de la molécule d'oxygène révèle la présence d'orbitales moléculaires de type σ et π. La figure 12 donne schématiquement le principe de la formation des liaisons et la répartition électronique de la molécule. Comme on peut le voir Fig. 13, l'oxygène atomique (O: $1s^2\ 2s^2\ 2p^4$)donne en configuration diatomique homonucléaire :

O_2 : $KK(\sigma\ 2s)^2\ (\sigma^*2s)^2\ (\sigma\ 2p_z)^2(\pi\ 2px)^2(\pi\ 2py)^2(\pi^*2px)^1(\pi^*2py)^1$

L'effet de l'orbitale liante $(\sigma\ 2s)^2$ est compensé par l'orbitale antiliante $(\sigma^*\ 2s)^2$.

Une des deux liaisons efficaces est due à l'orbitale moléculaire σ(2p). L'une des deux orbitales liantes dégénérées π(2 p) est compensée par les deux électrons célibataires des orbitales π^*(2 px) et π^* (2 py) antiliantes. La molécule O_2 comporte donc une double liaison (σ et π) et elle est paramagnétique bien qu'elle ait un nombre pair d'électrons.

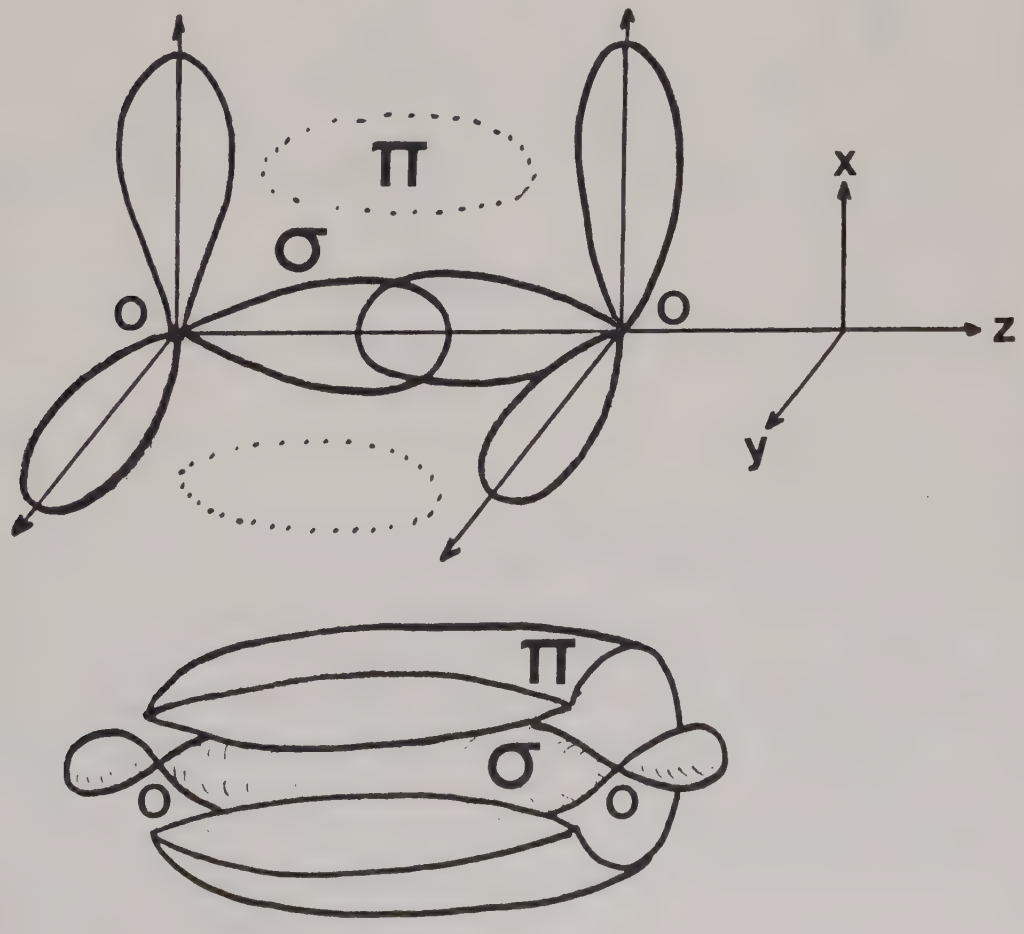


Fig 12. Formation de la double liaison (σ,π) dans la molécule O_2(seuls les lobes positifs des orbitales 2 p sont représentés) et répartition électronique des orbitales moléculaires σ et π .

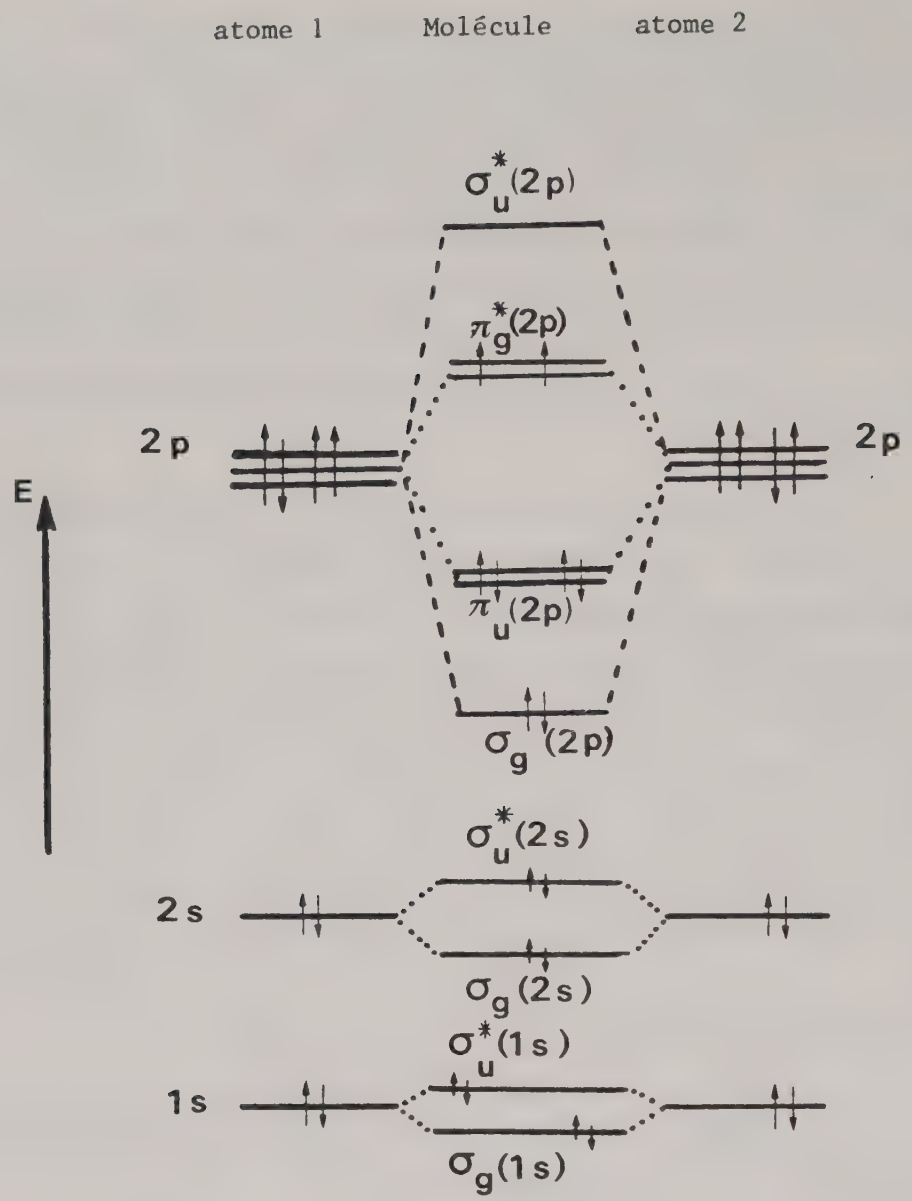


Fig. 13. Niveaux d'énergie atomiques et moléculaires pour O_2

La molécule diatomique hétéronucléaire CO n'a plus de centre de symétrie (le caractère g ou u disparait), seule la symétrie de révolution autour de Oz subsiste, et les orbitales sont donc de type σ,π.

La répartition en énergie des orbitales moléculaires est donnée figure 14.

La configuration électronique du carbone est $(1s)^2\ (2s)^2\ (2p)^2$. Il n'y a donc aucune orbitale π^* occupée

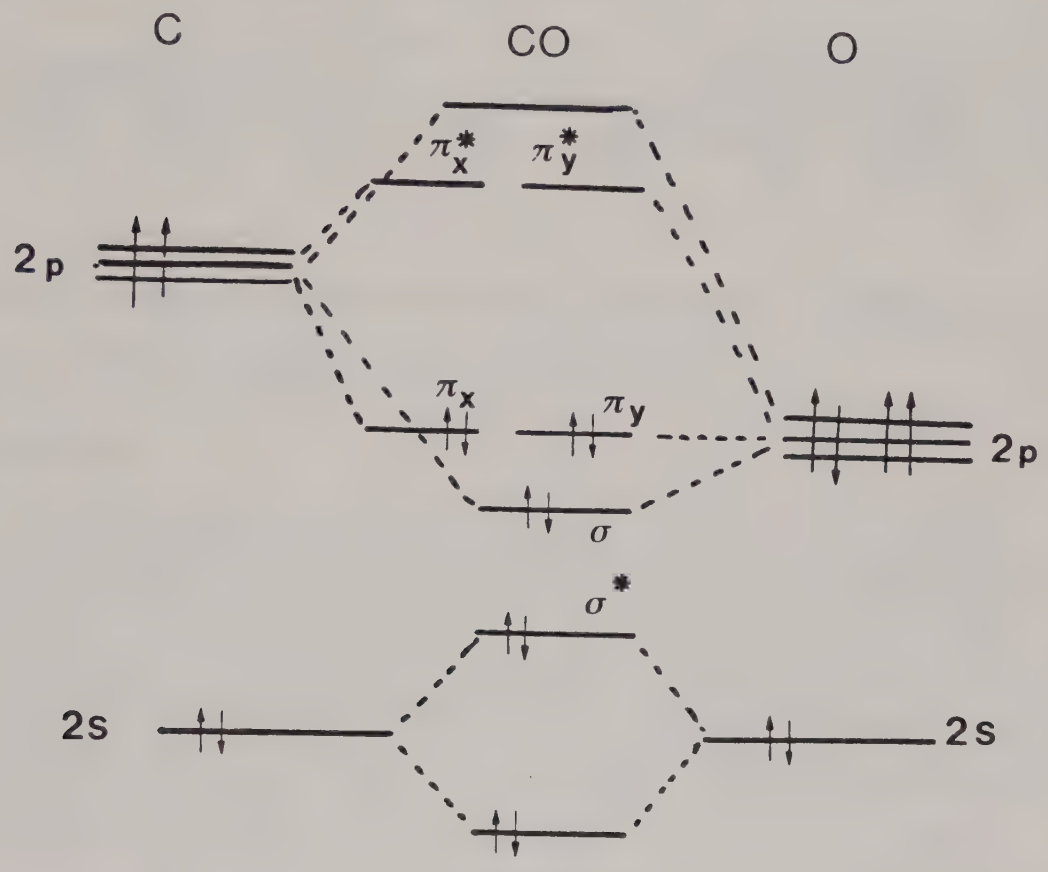


Fig. 14. Diagramme énergétique du CO

Le schéma de la figure 14 est une simplification. L'estimation des populations électroniques des orbitales de molécules hétéronucléaires nécessite le recours à des méthodes de calculs semi-empiriques.

La méthode du champ autocohérent de Hartree-Fock, associée à certaines approximations - négliger les intégrales de recouvrement de deux quelconques orbitales atomiques (CNDO) -, avec la détermination semi-empirique de paramètres, constitue la méthode de Pariser,Parr et Pople (PPP). Le tableau 3 donne la population des orbitales calculée suivant cette méthode pour la molécule CO.

	Atome de Carbone					Atome d'Oxygene				
	2s	$2p_x$	$2p_y$	$2p_z$	total	2s	$2p_x$	$2p_y$	$2p_z$	total
CO	1.74	0.63	0.63	1.08	4.09	1.74	1.37	1.37	1.44	5.91

Tableau 3 : Densité de charge des orbitales dans la molécule de CO

(d'après Case, Huynh et Karplus (1979)

Ces résultats indiquent que la structure σ du CO diffère radicalement de celle de O_2, principalement parce que les énergies des orbitales atomiques de l'oxygène sont plus négatives que celles de leurs homologues du carbone. Ceci conduit à une orbitale σ_4 (analogue hétéropolaire de la σ_u) qui est la combinaison antiliante des orbitales 2s et 2pσ de l'oxygène et de l'orbitale 2pσ du carbone (mais cette dernière contribue faiblement). Le fait que l'orbitale 2pσ du carbone ne contribue pas significativement à l'orbitale σ_4 se traduit par une charge négative du carbone de -0.3857 (Pople 1965) partiellement compensée par une dissymétrie dans les orbitales π en faveur de l'oxygène (moment dipolaire π=0.13 D).

La porphyrine

Le noyau porphyrique non-complexé avec un ion métallique est composé de 26 électrons π provenant de 24 atomes différents. Des électrons supplémentaires appartenant aux chaînes latérales (en particulier aux groupements vinyls) viennent modifier cette distribution du système fondamental d'électrons π. Dans la protoporphyrine le système électrons-π comporte 30 électrons. Cette molécule possède un squelette plan et appartient au groupe de symétrie D_4h.

Les orbitales moléculaires du complexe fer porphyrique

Les orbitales π . Les orbitales π de la porphyrine correspondent aux représentations A_{1u}, A_{2u}, B_{1g}, B_{2g} et E_{1g} du groupe D_{4h}. Les orbitales π

de l'ion ferreux(ou ferrique) qui peuvent se combiner avec celles de la porphyrine appartiennent aux mêmes représentations.

Les seules orbitales du fer satisfaisant cette condition sont les 3 dx^2-y^2 et 3 dyy (E_{1g}) et l'orbitale 4 pz (A_{2u}).

Dans les complexes " ioniques " (spin élevé), les orbitales 3 d du fer ne participent pas aux liaisons, l'orbitale 4 s de Fe^{++} est supposée vide, les 6 électrons de l'état 3 d étant répartis comme indiqué Figure 11. La seule orbitale du fer entrant en combinaison avec celles de la porphyrine est dans la 4 pz qui est inoccupée pour le fer libre.

Dans les complexes " covalents " (spin faible)quatre électrons de l'état 3 d participent à la liaison π du complexe. Ce sont les quatre électrons occupant les orbitales 3 dx^2-y^2 et 3 dyz qui possèdent la symétrie adéquate.

Les orbitales σ (En se limitant aux liaisons Fe-N porph). Les orbitales du fer pouvant être impliquées dans ces liaisons sont les orbitales 3 dz^2 et 4 s (A_{1g}), l'orbitale dxy (B_{1g}) et les orbitales 4px, 4 py et 4 pz (E_{1u}). Dans les complexes à fort spin (ferreux ou ferriques), seules les orbitales inoccupées 4s, 4 px et 4 py réalisent le système σ qui comporte ainsi 8 électrons des seuls atomes d'azote N-porph. Il existe donc 7 orbitales moléculaires σ.

Dans les complexes à spin faible, les orbitales 3 dz^2 et 3 dzy participent avec les azotes aux orbitales σ. Mais ici, encore, le fer ne fournit aucun électron.

L'imidazole de l'histidine F8

Les orbitales π de l'imidazole n'ont que très peu d'effet sur la structure électronique du complexe ferroporphyrine, leur caractère accepteur ou donneur d'électron π étant très faible. L'influence de la position asymétrique de l'imidazole sur l'occupation des orbitales de la porphyrine n'est pas encore claire.

Les orbitales moléculaires du complexe hème-O_2

Les travaux théoriques se rapportant à ce modèle ont utilisé à peu près toutes les techniques de calcul des orbitales moléculaires (Méthodes

de Hückel étendue, X_α, PPP, ab initio Hartree-Fock).

La configuration électronique de la liaison Fer-oxygène dans l'oxyhème a souvent été décrite comme le lieu d'un transfert de charge suivant le modèle $Fe^{3+}-O_2^-$ (Weiss, 1964; Wittenberg et coll., 1970; Cerdonio et coll., 1977; Weissbluth et coll., 1967; Koster et coll.,1975).

Le modèle de Pauling (1964) $Fe^{2+}O_2$, suggérant d'autre part une géométrie courbée (voir § 1.4), représente l'autre alternative et de nombreux travaux récents sont venus l'étayer. Ainsi, d'après Case, Huynh et Karplus, le transfert d'électron π dans les orbitales 2 px de O^1 et de O^2 (O^1 : atome d'oxygène central, O^2: atome d'oxygène terminal) est exactement contre balancé par le passage d'électron de l'orbitale atomique 2s de O^1 vers l'orbitale moléculaire σ du fer. En conséquence, les calculs selon le modèle PPP, indiquent : i) qu'il n'existe aucun argument en faveur du modèle anion superoxyde O_2^- de Weiss.

ii) que l'atome de fer possède une charge positive très légèrement supérieure à celle d'un atome de fer isolé ($3\,d^6\,4s^2$). La charge effective sur le fer dans l'hème O_2 correspond à une interpolation linéaire des deux configurations $3\,d^6 4s^2$ et $3\,d^5 4s^2$ (charge nette :+ 0.45, par comparaison, dans hème-CO, Fe possède une charge de + 0.08). Ceci s'explique par le transfert, lors de la complexation de Fe^{2+} avec la porphyrine, de 0.4 électron σ par azote N porph et de 0.1 électron π pour chaque N porph. Le système σ de l'imidazole participe par ailleurs avec 0.35 électron. L'ion ferreux est donc neutralisé par ses 5 liaisons azote, la liaison avec l'oxygène sera donc essentiellement covalente, avec un très faible transfert de charge.

Ces mêmes calculs (PPP) conduisent aux populations d'orbitales suivantes : (les coordonnées x',y',z' correspondent à un système local avec l'axe z' suivant O^1-O^2 et x' perpendiculaire au plan $Fe-O^1-O^2$)

Fe : $(dx^2-y^2)^{2.0}\ (dyz)^{1.74}(dxz)^{1.36}(dz^2)^{0.53}(dxy)^{0.56}$

O^1: $(2px')^{1.27}\ \ (2py')^{1.88}(2pz')^{1.12}$

O^2: $(2px')^{1.14}\ \ (2py')^{1.99}(2pz')^{1.14}$

Cette distribution est compatible avec la présence en quantités égales de deux espèces à états de spin couplés :

$Fe^{2+}(S=0)$, O_2 $(S=0)$ et Fe^{2+} $(S=1)$, O_2 $(S=1)$

L'état singulet-singulet possède la configuration suivante :

$Fe : (dx^2-y^2)^2\ (dyz)^2\ (dxz)^2\ (dz^2)^0 (dxy)^0$

$O^1 : (2px^1)^1\ (2py')^2\ (2pz')^1$

$O^2 : (2px')^1\ (2py')^2\ (2pz')^1$

Pour l'état triplet-triplet la configuration devient :

$Fe : (dx^2-y^2)^2\ (dyz)^2\ (dxz)^1\ (dz^2)^1\ (dxy)^0$

$O^1 : (2px')^{1.5}\ (2py')^{1.5}\ (2\ pz')^1$

$O^2 : (2px')^{1.5}\ (2py')^{1.5}\ (2\ pz')^1$

Cette dernière ressemble au modèle de type ozone.

En conclusion, le débat sur la structure électronique de la liaison Fe-O_2 se résume à la valeur du transfert de charge du groupe hémique vers la molécule d'oxygène (Makinen et coll. 1978). A l'exception du travail de Kirchner et Loew(1977),les données théoriques de la littérature indiquent que la molécule d'oxygène reste neutre.

Les orbitales moléculaires du complexe hème-CO

Le complexe hème-CO possède une distribution de charges que l'on peut idéaliser à une espèce du type : $Fe^{2+}(S=0)$, $CO(S=0)$. La ligandation avec le CO affecte relativement peu la distribution des charges de la porphyrine : transfert CO→porphyrine de 0.45 électron σ et en retour de 0.2 électron π . Dans le complexe CO, le fer est plus négatif que dans le complexe O_2 et l'atome du carbone est ainsi positif (+ 0.21)(Case et coll. 1979).

1.3.2. Spectroscopie Mössbauer

La spectroscopie Mössbaüer est une technique où seules les interactions affectant le noyau du fer (^{57}Fe) sont détectées. Très tôt appliquée aux hémoprotéines (Karger, 1962; Maling et Weissbluth, 1964), cette technique a révélé le caractère-ferreux, spin élevé-de la déoxyhémoglobine. Dans le

cas de l'oxyhémoglobine, l'attribution d'un caractère faible spin-fer ferreux impliquait une forte asymétrie dans la configuration des orbitales 3 d délocalisées. La corrélation entre les résultats expérimentaux et les modèles théoriques (X_α, Huckel étendue, PPP) révèle que la position relative des bandes du spectre Mösbauer est essentiellement gouvernée par les orbitales d. Il est donc possible d'interpréter ces spectres à l'aide des calculs des orbitales moléculaires en termes d'occupation des orbitales d. Il en résulte que la distribution électronique dans les orbitales d est compatible avec le modèle $Fe^{2+}O_2$ proposé précédemment, et que le complexe hème-CO est ferreux, spin-faible.

1.4. LA GEOMETRIE Fe-LIGAND

La liaison Fer-oxygène

La géométrie du complexe oxyhème a fait l'objet d'un débat depuis la proposition de Pauling (1964) d'une structure courbe $Fe\text{-}O_2^2\text{-}O^2$ et celle de Griffith(1956) d'une forme triangulaire (figure 15)

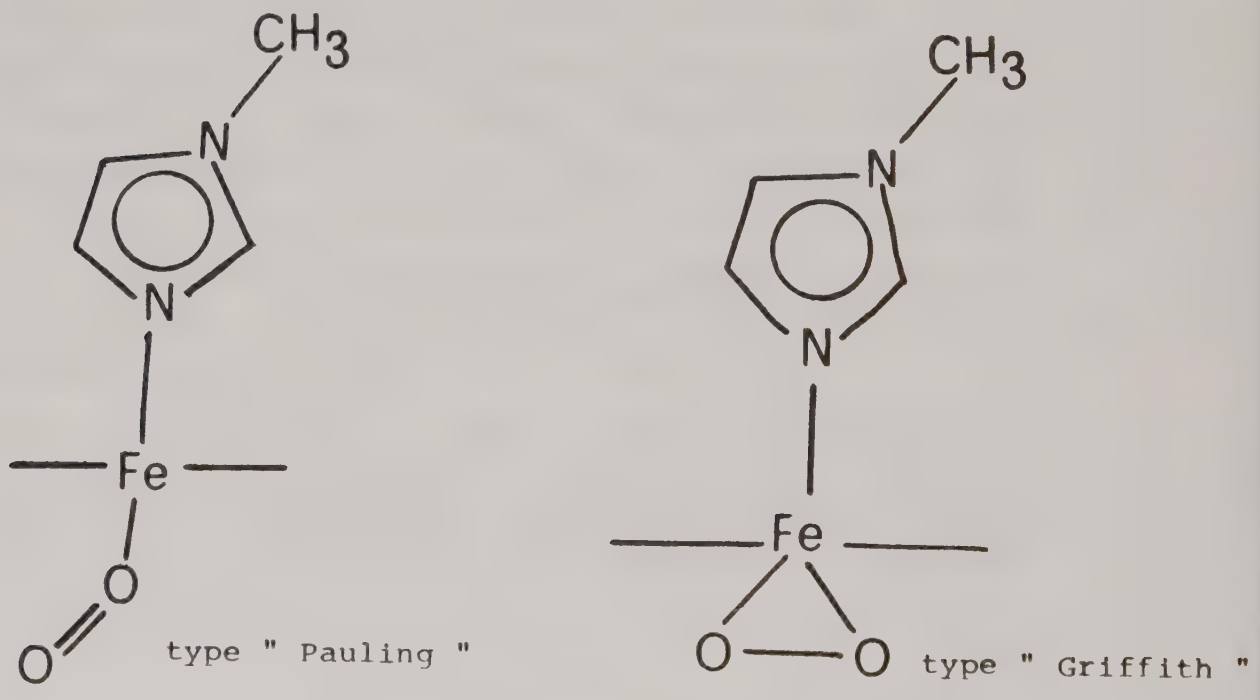


Fig15 Géométries de l'oxyhème

L'absence de données de la diffraction X jusqu'en 1980, a permis aux deux " écoles " de s'exprimer. Il existait cependant des arguments issus des modèles de la dynamique moléculaire en faveur de la configuration type Pauling (Case et Karplus, 1979). Ces auteurs ont présenté une carte des

niveaux d'énergie dans l'environnement de l'hème (figure 8), révélant une zone à faible énergie potentielle (minimum x $\sim$ 1 Å, y $\sim$-2 Å) correspondant à la position de l'atome d'oxygène distal. Cette position implique un angle Fe-O-O inférieur à 180°. A la même époque, des données de spectroscopie d'absorption associées au calcul des structures d'orbitales (Makinen et coll. 1978) dans MbO_2 aboutissaient à la même conclusion. Des résultats de spectroscopie Raman de résonance (Duff et coll. 1979) concernant les fréquences propres des distances $Fe-O^1-O^2$ en utilisant une combinaison isotopique asymétrique ($^{16}O - ^{18}O$) ont conforté cette conclusion. Nous pouvons aussi citer les travaux en spectroscopie d'absorption infrarouge de Barlow et coll. 1973, Maxwell et coll. 1974; Collman et coll. 1976.

Cependant, ce sont les travaux de S.E.V. Philipps en 1978 et 1980 pour MbO_2 et ceux de B. Shaanan en 1982 qui ont transformé en fait établi ce qui n'était qu'une hypothèse vraisemblable.

Les résultats de Phillips pour la structure de MbO_2 à 1.6 Å donnent à l'angle Fe-O-O la valeur de 115° (Phillips, 1980). La structure de HbO_2 réalisée par B. Shaanon (1982) révèle un angle Fe-O-O de 156 $\pm$ 10° pour les sous-unités α et β.

Le tableau 4 donne l'ensemble des résultats sur la géométrie $Fe-O_2$.

	Fe-O (Å)	O-O (Å)	Fe-O-O ( )
Fe O_2(picket-Fence)(2-Me Im)	1.898	1.22	129
Fe O_2(picket-Fence)(1-Me Im)	1.75	1.16	131
MbO_2	1.83	1.22	115(5)
HbO_2(sous-unité α)	1.67	1.22	153(10)
HbO_2(sous-unité β)	1.83	1.24	159(10)

Tableau 4 : Stéréochimie de la liaison $Fe-O_2$(d'après S.E.V. Phillips, 1980; B. Shaanon 1982; Jameson et coll, 1978)

La liaison Fer-CO

La structure de HbCO a révélé que le groupement Fe-C-O est linéaire mais écarté de 13-14° de la normale au plan de l'hème (Baldwin, 1980). Cette position pourrait être la conséquence de répulsions stériques des chaînes distales Val E 11 et His E 7. Il faut noter que l'atome d'oxygène du CO se trouve à 3.2 Å de la Val E 11 sans qu'il y ait réalisation d'une liaison (Figure 16)

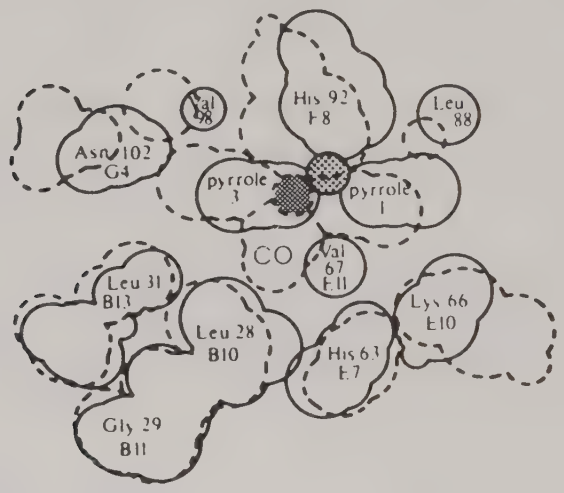


Fig 16 . Structure de HbCO dans l'environnement proche de l'hème. D'après Baldwin (1980).

1.5. AFFINITE ET INFLUENCE DE L'HISTIDINE DISTALE (E 7)

L'affinité de l'oxygène pour une hémoprotéine est usuellement exprimée par la P_{50}(pression partielle d'oxygène pour une saturation de 50%).

Or, bien que l'environnement du fer dans l'hème soit une constante dans les différentes hémoglobines,les valeurs des P_{50} vont de 0.004 mmHg (hémoglobine d'Ascaris) à 1000 mm Hg chez certaines hémoglobines de poisson à pH acide. Ceci révèle la fantastique influence de la globine sur le fer hémique. Mais, quelle(s) est(sont)la(les)liaison(s) avec le fer, responsable(s) d'une telle modification de la réactivité avec l'atome de fer?

La mise en évidence d'un pont hydrogène entre la molécule d'oxygène et l'histidine distale dans MbO_2(S.E.V Phillips et P. Schoenborn, 1981) offre une autre possibilité au cheminement classique, via l'histidine F 8, d'une contrainte de la globine sur l'hème (figure 17).

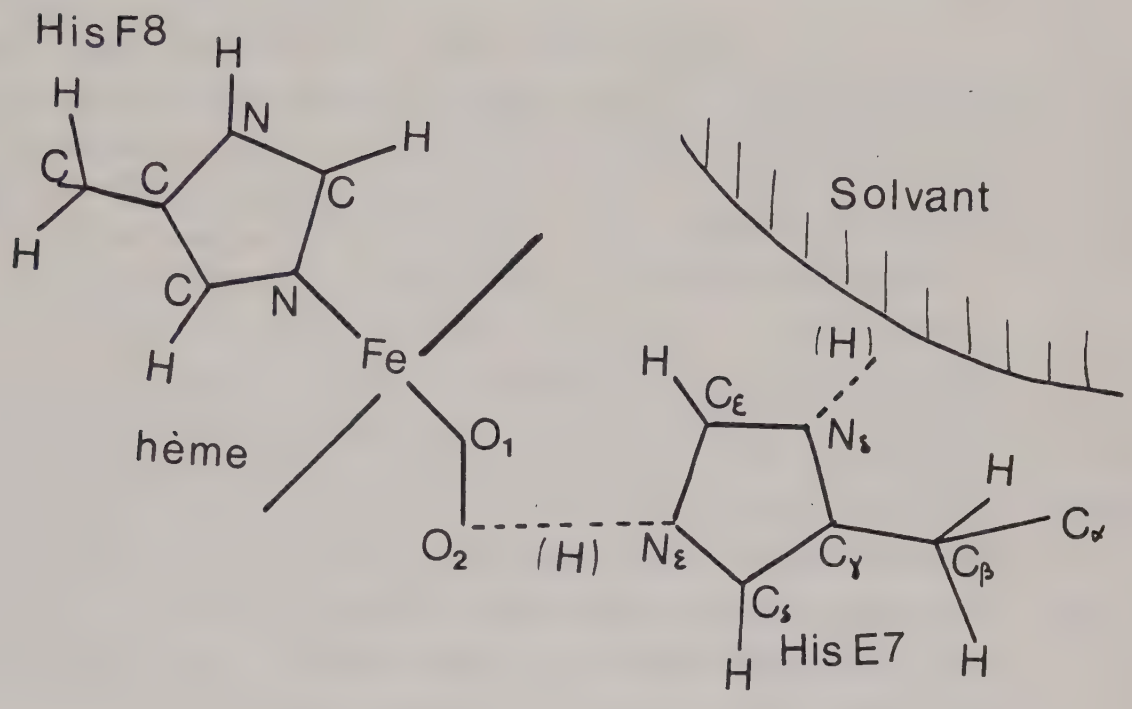


Fig. 17 . Pont hydrogène O_2-N_ε(His E 7), d'après S.E.V. Phillips et P. Schoenborn, 1981).

Ce pont hydrogène contribue pour plusieurs k cal/mol à l'enthalpie de ligandation de l'oxygène. La position de l'imidazole E 7 pourrait être ainsi un moyen de contrôle de l'affinité de l'oxygène dans Hb et Mb, très efficace.

Dans le cas des carboxyhémoprotéines, en particulier pour MbCO, la présence d'un pont hydrogène est moins évidente.

Les résultats de la diffraction de neutrons, même s'ils laissent supposer l'absence de pont hydrogène CO---N_ε(His E7), ont une précision insuffisante pour complètement l'exclure. D'autre part, la distance N_ε(His E 7) - O(CO)est de 2.7 Å (Mb CO). Cette valeur est très faible pour une interaction N---O,sans réalisation d'une liaison.

I.6. ROLE DE L'HISTIDINE PROXIMALE (F 8) DANS LE MECANISME DE COOPERATIVITE

En langage allostérique, la coopérativité de l'hémoglobine s'exprime en termes d'états conformationnels de faible affinité(état T) en structure déligandée, et d'état ligandé à forte affinité (R) (Monod et coll. 1965). La structure T deoxy se caractériserait, suivant ce schéma, par une contrainte proximale (F 8) et des effets stériques distaux, alors que la conformation R verrait ces effets absents ou réduits(Perutz 1970, 1972). L'hypothèse de la contrainte " stockée " dans la liaison His F8-fer a été testée dans des composés hémiques simples utilisant un 2-méthyl imidazole (modèle de l'état T) ou un 1-méthyl imidazole (modèle de l'état R)comme base axiale. La présence d'une contrainte doit s'exprimer par un atome de fer relativement moins coplanaire à l'hème dans la forme T. En utilisant ce critère, il a été observé l'absence de contrainte dans le complexe 2-MeIm déligandée(Jameson 1980). L'idée de la présence d'une contrainte dans le seul cas d'une structure T ligandée semble de plus en plus obtenir un consensus (contrairement aux premières propositions de Perutz qui postulait la présence d'une tension en structure T déligandée).

L'utilisation des techniques de Raman résonnant a permis de confirmer cette hypothèse. Nagai et coll.(1980) attribuent la fréquence Raman à 216cm^{-1} dans la deoxyhémoglobine, à un mode de vibration propre à la liaison Fe-N_ε(His F 8). La modification de cette fréquence en configuration T (215→218 cm^{-1}) est interprétée comme révélant un renforcement de la liaison, consécutif à la tension exercée par la globine. L'énergie que représente cette contrainte est cependant, pour ces auteurs, trop faible pour rendre compte de l'énergie libre de coopérativité. Ils proposent en plus une énergie partiellement stockée dans une contrainte $C_\varepsilon H$(His F 8)- N porph (aussi proposé par Baldwin et Chothia,1979) et partiellement sous forme de contraintes rotationnelles internes à la globine(C-C,C-N).

Cependant, l'attribution des fréquences entre 180 et 260 cm^{-1} à des modes de vibrations propres à la liaison Fe-N_ε(His F 8)(ou Fe-N (Im)) est sérieusement contestée par Desbois, Lutz et Banerjee (1981 a,b,c) qui attribuent cette bande (libellée bande II) à un mode propre de la liaison Fe-N porph. La régulation de l'affinité de l'oxygène est alors interprétée en termes d'amplitude de distorsion de l'hème (position relative du fer et du plan de la porphyrine), préférentiellement à une contribution d'une tension N_ε(His F 8)-Fe.

Récemment, Dalvit et coll (1982) ont analysé l'influence d'une transition R-T dans l'hémoglobine de carpe en forme deoxy, par l'enregistrement des fréquences Raman entre 200 et 350 cm^{-1}. En continuant d'attribuer la bande à 210 cm^{-1} au mode de la liaison Fe(II)-N_ε(His F 8), ils concluent par l'apparition d'une tension lors de la transition R-T.

La dépendance à la température de la position et de la largeur de cette bande a été mise en évidence par Ondrias et coll (1982). Ceci est interprêté comme révélant la présence d'un système dynamique où les fluctuations de l'énergie de liaison Fe-His seraient la conséquence d'un couplage non-harmonique entre différents modes. Parmi les modes suspectés, nous citerons les modes internes à l'imidazole et à la porphyrine ou le mouvement de libration de l'imidazole relativement à la porphyrine.

La sensibilité à la transition R-T n'est pas similaire dans les sous-unités α et β. Ceci a été révélé par Ondrias et coll.(1982), par une étude de la forme et de la position de la bande Raman à 220 cm^{-1} dans des hybrides fer-cobalt. Ces auteurs concluent à une plus grande sensibilité de l'interaction globine-hème dans les sous-unités α.

1.7. LE MOUVEMENT DE L'ATOME DE FER COMME MECANISME " TRIGGER "

Nous avons vu précédemment que d'après les données de la diffraction X, les atomes de fer hémiques 6 fois coordonnés possèdent un atome de fer Fe^{2+}, spin faible dans le plan de l'hème, alors que les hèmes déligandés ont un atome de fer, spin fort, 0.5 à 0.7 Å en dehors du plan de l'hème. Hoard (1971,1975) a suggéré que ce changement d'état de spin lors de la ligandation et, en conséquence, la position du fer par rapport au plan de l'hème, est probablement le point de départ du mécanisme rendant compte de la coopérativité.

Perutz propose alors (1970,1972,1978,1979) que ce mouvement soit le mécanisme essentiel déclenchant les changements stucturaux de l'hémoglobine lors de l'oxygénation. Avec l'hypothèse décrite précédemment d'une contrainte N_{ε}(His F 8)-Fer, le modèle de la coopérativité s'affine et Baldwin et Chothia (1979) proposèrent un schéma comportant 2 types de changements structuraux dans l'environnement proche de l'hème. Le premier est décrit comme une contrainte proximale : lors de la ligandation, le fer revient dans le plan de l'hème entraînant une inclinaison de l'hélice F et un déplacement vers l'hème de 1 Å. L'histidine proximale devient ainsi plus symétrique par rapport aux N porph. Les modifications du 2ème type sont décrites comme des effets stériques distaux. Brièvement ceux-ci rendent compte : i) du mouvement des chaînes α et β de 0.5 Å et de 1.5 Å par rapport à la poche de l'hème,

ii) de la rotation de l'hème de 9° vis à vis de l'hèlice E et de l'interface α,β,

iii) et de la translation de l'hème β en direction de la Val E 11 (figure 18).

Ainsi le mouvement important du fer et de l'histidine proximale est considéré comme étant le mécanisme " trigger " qui déclenche l'important changement conformationnel dans la structure quaternaire (T → R) lors de la ligandation.

Nous devons, en conclusion, mentionner le fait suivant :

La transition conformationnelle R-T dans l'hémoglobine représente les déplacements d'un très grand nombre d'atomes (Baldwin et Chothia(1979). Un aspect intéressant de ces données est que la plupart de ces déplacements possèdent une amplitude inférieure à 1.0 Å, c'est-à-dire de l'ordre de grandeur des mouvements dus à l'agitation thermique. Seulement quelques résidus possèdent des amplitudes de déplacement plus importantes. Autrement dit, les positions relatives instantanées de deux atomes quelconques ne sont pas suffisantes pour définir les 2 états conformationnels et seulement la détermination simultanée des positions relatives d'un grand nombre d'atomes peut définir un type de conformation.

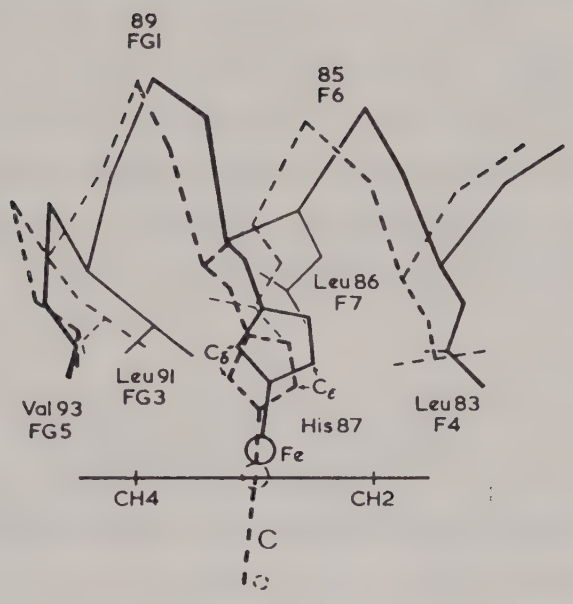


Fig. 18 Changements distaux et mouvement du fer lors de la ligandation (d'après Baldwin et Chothia 1979)

CHAPITRE II

SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION RESOLUE DANS LE TEMPS

2.1. INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous présentons l'intérêt et les limites de la spectroscopie d'absorption dans la compréhension des mécanismes régulateurs de la réactivité de l'hème. Nous verrons comment, associée à la technique de photolyse, elle permet d'accéder aux données dynamiques.

L'interprétation des spectres transitoires nécessite la connaissance de la nature des transitions électroniques. Nous en ferons une brève revue à partir des données théoriques et expérimentales de la littérature. L'influence de la structure locale de l'hème sur ces transitions sera évoquée, tout au moins pour celles d'entre elles nécessaires à notre démonstration ultérieure.

Nous signalons les limites dans l'interprêtation des spectres de différence, quand l'espèce ligandée ne subit pas une photodissociation complète et que le produit après photolyse n'est pas un mélange binaire. Dans la dernière partie de ce chapitre nous introduirons les caractéristiques spécifiques et les résultats de la littérature concernant la spectroscopie d'absorption picoseconde. Des limites de cette technique et des contradictions dans ses résultats, nous justifierons notre effort vers une résolution temporelle de deux ordres de grandeur supérieure.

2.2. SPECTRE D'ABSORPTION ET TRANSITIONS ELECTRONIQUES DU NOYAU PORPHYRIQUE

2.2.1. Les modèles théoriques

Les bandes d'absorption correspondant aux transitions électroniques de la globine n'interfèrent pas sur celles de l'hème, ce qui simplifie l'établissement des correspondances transitions-bandes d'absorption.

Nous nous intéressons ici aux seules transitions provenant de l'hème. Les bandes d'absorption correspondantes se situent entre 0.5 et 4.5 eV. Les transitions d'énergie supérieure sont masquées par celles de la protéine.

Les données de la spectroscopie et les calculs des transitions sont essentiellement concordants quant à l'attribution des bandes les plus intenses à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de la porphyrine. La position et la forme de ces bandes sont variables d'une hémoprotéine à une autre et suivant l'état et la nature de la ligandation axiale, mais ces données ne les affectent pas de façon drastique. Les transitions moins intenses correspondant à des transferts de charge avec l'atome de fer central, sont beaucoup plus sensibles à ce paramètre. Ces transitions sont certainement responsables des bandes d'absorption dans le proche infra rouge, tout au moins dans le cas des oxyhémoprotéines.

Il existe d'autre part des bandes très faibles qui sont attribuées à des transitions d-d du champ cristallin.

La présence de transitions intrinsèques au ligand axial est aussi suspectée.

Le tableau 5 emprunté à Case et coll.(1979) donne le récapitulatif de ces transitions.

Le libellé est celui proposé par Eaton(1978).

Libellé des bandes d'absorption	I	II	III	IV	Q	V	VI	Soret B	N	VII	
Energie d'excitation(ev)	0.95	1.08	1.26	1.59	2.22	2.28	2.73	2.99	3.60	3.84	Résultats expérimentaux
Force d'oscillateur				0.0021	0.12		0.022	1.3	0.54	0.15	
Polarisation			x	yz	xy		z	xy	xy	z	
Eaton et coll.(1978)	$dyz \rightarrow dxy + {}^{0}_{2}\pi^{*}$	$dx^2-y^2 \rightarrow dxy + {}^{0}_{2}\pi^{*}$	$a_{2u}\, dxy + {}^{0}\pi^{*2}$	$a_{1u} \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$	$\pi \rightarrow \pi^{+} x$	d+d	d→d	$\pi \rightarrow \pi^{*}$	$\pi \rightarrow \pi^{*}$	${}^{0}_{2}\pi_{u} \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$	Nature des transitions
Churg et Makinen (1978)			$a_{2u}, a_{1u} \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$				$a_{2u}, a_{1u} \rightarrow dz^2$				
Case, Huynh, Karplus (1979)	$dyz + {}^{0}_{2}\pi^{*} \rightarrow \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$	$dxz + e_g \rightarrow dxz + {}^{0}\pi^{*2}$ ou $dyz + eg \rightarrow e_g + {}^{0}\pi^{*2}$	$a_{2u} \rightarrow dxy + {}^{0}\pi^{*2}$ ou $dxz + e_g \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$	$a_{1u} \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$ ou $dyz + e_g \rightarrow dxz + {}^{0}_{2}\pi^{*}$			d→d ou $a_{2u} \rightarrow dz^2$ ou $dxz + e_g \rightarrow$ Im				

Tableau 5 (d'après Case, Huynh et Karplus (1979)) : Bandes d'absorption et nature des transitions pour l'oxyhémoglobine.

Pour la carboxyhémoglobine, les transitions sont plus réduites : tableau 6

Libellé des bandes	I	Q	II	B	N
Energie d'excitation(eV)	1.98	2.2	2.21	2.96	3.6
Force d 'oscillateur		0.1		1.0	0.5
Polarisation		xy		xy	xy

Tableau 6 : Bandes d'absorption dans la carboxyhémoglobine

2.2.2. L'influence de la protéine

Dans HbCO et HbO_2, il est possible de mesurer le spectre d'absorption en structure T par l'utilisation d'une hémoglobine anormale, Hb Kansas (Asn G 4(102) β→Thr).

Dans les hémoglobines de poisson possédant un effet Root, structure T ligandée est observable pour HbCO(HbO_2 se dissocie). Lors de cette transition R → T, la bande de Soret de HbCO est déplacée vers les longueurs d'onde plus grandes d'environ 1 nm.

HbNO est le modèle le plus spectaculaire pour visualiser l'influence de la protéine sur le spectre d'absorption. L'addition d'inositol hexaphosphate (IHP) est réputée pour provoquer une transition R→T. Celle-ci s'accompagne d'une translation vers le bleu avec réduction en intensité des bandes de Soret et Q, ainsi que l'apparition de nouvelles bandes de type spin élevé à 495, 518 et à 603 nm, bien que le complexe reste spin faible (figure 19).

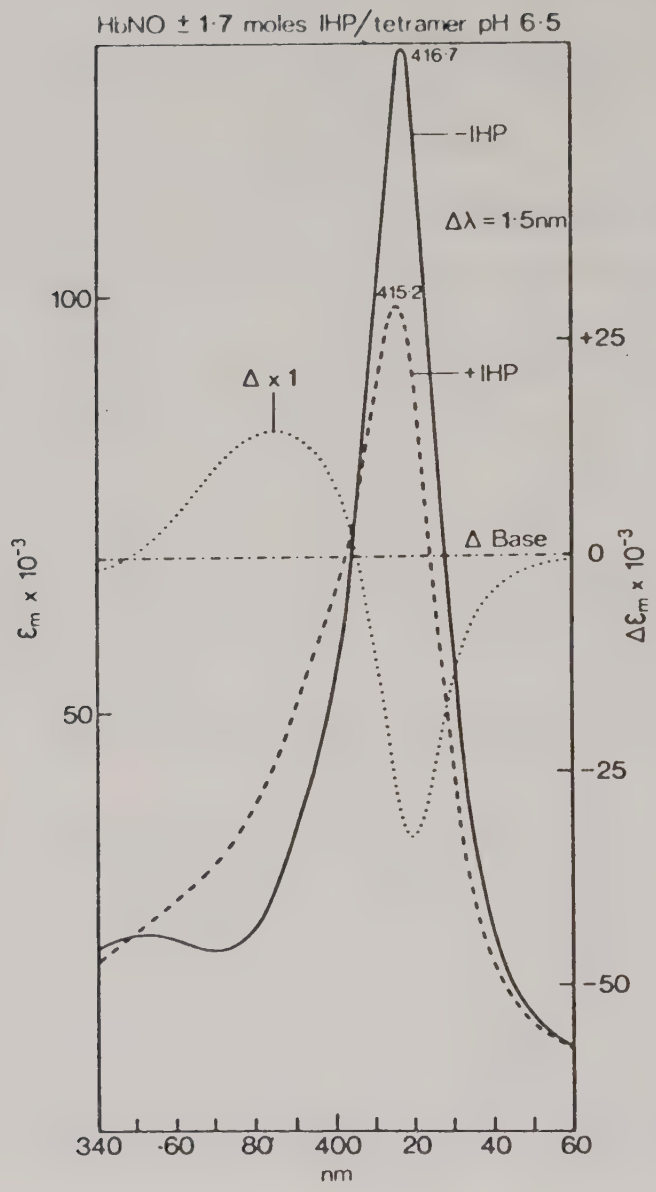


Figure 19 La bande de Soret de HbNO ± IHP et le spectre de différence (d'après Perutz et coll. 1979).

Ce changement spectral est essentiellement provoqué par la rupture de la liaison Fe-N_ε dans les sous-unités α.

2.2.3. La contrainte N_ε(His F 8)- hème

L'influence sur le spectre d'absorption de la contrainte N_ε-hème, est révélée d'une manière spectaculaire par l'exemple du paragraphe précédent avec HbNO + IHP et la rupture de cette liaison dans les sous-unités α.

Moins spectaculaires, mais plus utiles dans l'interprêtation des spectres transitoires, sont les tentatives de corrélation entre les spectres visibles (Soret incluse) et la modulation de la tension fer-N_ε. Wang et Brinigar (1979) ont réalisé un tel travail en reprenant certaines données de la littérature, tant expérimentales que théoriques(Perutz, Brinigar, Gelin...). La corrélation a été établie dans les deux sens, c'est-à-dire en considérant des conditions réputées augmentant l'interaction et des conditions la diminuant.

Le critère de position de la bande d'absorption est donné par la valeur de λ_{max} (valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption). Il démontre ainsi qu'une diminution de λ_{max} (décalage vers le"bleu") correspond à une diminution de l'interaction Fe-N_ε et symétriquement, une augmentation de cette interaction s'accompagne d'un décalage vers le rouge (augmentation de λ_{max}) (exemple: décalage versle rouge de la bande de Soret de la carboxyhémoglobine de truite IV et de carpe lors de l'abaissement du pH).

Cependant, bien qu'il existe une quantité importante de données expérimentales pour établir cette corrélation, certaines ambiguités persistent, en particulier le degré du transfert de charge en fonction du ligand.

Nous devons aussi mentionner un des résultats des modèles théoriques de Eaton et coll(1978) qui révèle que le passage, forme plane-forme de dôme (déplacement du fer de 0.62 Å) du noyau porphyrique, modifie les énergies des orbitales de seulement 0.05 eV.

2.3. SPECTRES DE DIFFERENCE HEME DELIGANDE-HEME LIGANDE

2.3.1. Spectres de différences à l'équilibre

Les modifications spectrales induites par une excitation picoseconde étant généralement d'amplitude réduite, les résultats sont exprimés en termes de spectres différentiels. Le spectre de référence correspond, dans ce cas, au spectre avant excitation, c'est-à-dire au spectre de l'espèce ligandée.

L'analyse du spectre de différence (ΔA) paraît donc plus démonstrative que la présentation du spectre absolu transitoire, en particulier parce que le spectre ΔA est très sensible à tout décalage en longueur d'onde (voir figure 19).

Cette très grande sensibilité aux décalages en longueur d'onde génère ses propres inconvénients. En effet, de nombreuses perturbations dans la structure ou dans la distribution électronique de l'hème, sont susceptibles de provoquer des différences sensibles des niveaux électroniques fondamentaux et excités. Ainsi, des spectres de différences identiques pourront provenir de différentes combinaisons de perturbations.

2.3.2. Le problème des états excités transitoires

L'interprétation des spectres différentiels serait grandement facilitée s'il était possible, à chaque instant, de faire l'hypothèse de l'existence de seulement deux espèces : une ligandée et l'autre photodissociée (ou plus généralement photoexcitée). Il n'est malheureusement pas possible d'exclure, dans les excitations picosecondes, la présence d'états excités ligandés et déligandés qui viennent s'ajouter aux contributions des états fondamentaux. Il faut donc être très prudent dans la caractérisation d'une espèce photodissociée par analyse de son spectre ΔA, en comparaison de celui à l'équilibre. Ainsi un spectre ΔA transitoire modifié par rapport au spectre ΔA stable, peut être interprété comme caractérisant une espèce déligandée excitée ou la présence simultanée de deux espèces(au moins), une déligandée stable + une espèce excitée.

Cependant, de nombreuses espèces excitées possèdent des durées de vie de quelques picosecondes(Cornelius,1981 b.). L'utilisation d'impulsions lumineuses subpicosecondes en spectroscopie doit donc permettre une double discrimination temporelle et en fréquence,qui conduira à distinguer, par leur évolution temporelle, les états excités des espèces photodissociées.

2.3.3. Décalage en fréquence et excitation vibrationnelle

L'utilisation de données de la spectroscopie d'absorption pour caractériser des modes de vibration des liaisons de l'hème, nécessite une grande prudence et possède un caractère un peu spéculatif. Cependant, connaissant les modes de vibration propres à certaines liaisons , grâce aux données de la spectroscopie Raman, il est possible de proposer des types de mode de déformation dans l'environnement de l'hème, à partir des résultats de la spectroscopie d'absorption.

Ainsi dans le cas spécifique de la liaison N_{ε}(His F 8)-Fer, nous avons vu précédemment (§ 2.2.3) qu'il était possible d'obtenir des informations à partir de la spectroscopie d'absorption.

Plus généralement, Sawicki et Gibson (1977) ont analysé le décalage du spectre de différence Hb-HbCO dans l'hémoglobine de thon, en fonction de l'affinité de l'état T.

Par ailleurs, l'ordre de grandeur des modes de vibration des liaisons de l'hème (figure 20) donne une idée du retentissement possible sur le spectre d'absorption(décalage de quelques nm)

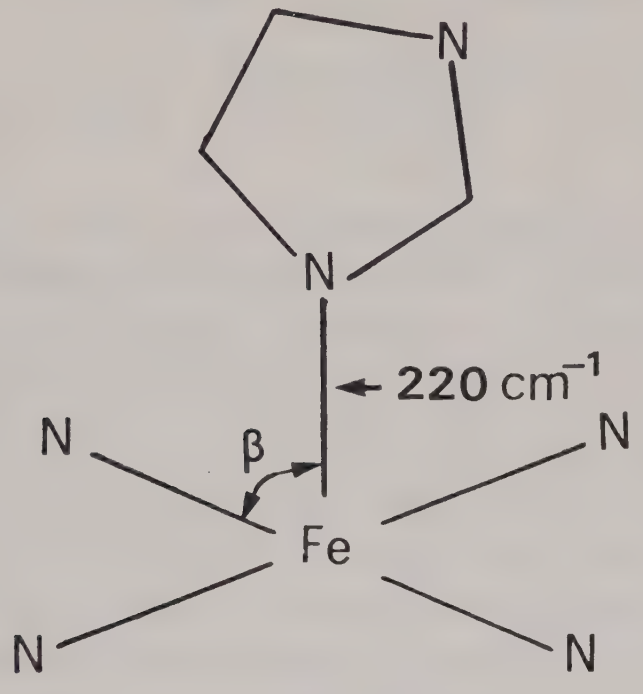


Figure 20 Modes de vibration dans l'environnement de l'hème :
mode (N-Fe) $\simeq$ 220 cm^{-1} (a) mode angulaire $\beta \simeq 80$ cm^{-1} (b)

(a) D'après (par exemple) Nagaï 1980

(b) R. Perutz (communication personnelle)

2.4. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION PICOSECONDE

2.4.1. Principe - Génération d'un continuum

La spectroscopie picoseconde s'est développée dans les I5 dernières années après que De Maria et coll.(1966) aient réalisé le premier laser picoseconde. Son intérêt en biologie est très vite apparu, car dans ce domaine une haute résolution spectrale n'a que peu d'intérêt en regard de la mise en évidence d'états à très courte durée de vie.

Nous ne ferons pas ici une présentation exhaustive des sources picosecondes. Brièvement, les résultats de spectroscopie picoseconde proviennent de systèmes utilisant les lasers solides comme source :

- laser Néodyme/verre
- " Néodyme/ YAG YAG(yttrium aluminium garnet)
- " rubis

A ces lasers picoseconde, ont succédé les lasers à colorant qui ont pour avantages d'avoir une fréquence de répétition supérieure et de produire des impulsions plus courtes. Shank et Ippen ont, ainsi, pour la première fois réussi à produire des impulsions subpicosecondes en 1974, en pompa un colorant par un laser argon continu. En 1975, nous avons entrepris la réalisation d'un système analogue, avec en parallèle dès 1977, le développement d'un laser à colorant pompé de façon synchrone par un laser argon à modes bloqués. Nous verrons dans le chapitre 3 l'évolution de ces systèmes et le choix que nous avons effectué. L'amplification de ces impulsions par Shank et coll.(1978) pour le premier système, et par nous-mêmes pour le système synchrone (Martin et coll. 1979) a permis de réaliser un système opérationnel en spectroscopie subpicoseconde.

Un aperçu des différents systèmes est présenté tableau 7.

TABLEAU 7

aser	Longueur d'onde (nm)	Taux de Répétition	Puissance instantanée (GW)	Energie par impulsion (mJ)	Durée d'impulsions en picosecondes (ps)
aser à rubis amplificateur ème harmonique	694.3 347.2	tir unique	1-2 0.1-0.2	20-40 2-4	20 15-20
aser Néodyme/Verre amplificateur ème harmonique	1060 530	tir unique	5-10 0.5-1	50 5	5-8 4-6
aser Néodyme/YAG ème harmonique	1064 532	1-10 Hz 1-10 Hz	1 0.1	30 3	30-50 20-40
aser à colorant hodamine 6G (Rh6G) blocage de modes assif système A)	618	0.5 MHz	$2x10^{-6}$	10^{-6}	0.5
aser à colorant Rh 6G) à pompage ynchrone par laser rgon à modes bloqués système B)	590-630	80 MHz	$2x10^{-6}$	10^{-6}	0.5
ystème A + mplificateur	618	10 Hz	2	1	0.5
ystème B + mplificateur	600-630	10 Hz	2	1	0.5

Tableau 7 Lasers en spectroscopie picoseconde

Le système de spectroscopie d'absorption doit permettre l'enregistrement d'un spectre transitoire à un instant donné, ou l'évolution temporelle de l'absorption à une longueur d'onde fixée.

Le premier est nécessaire pour identifier l'espèce transitoire et la dernière technique pour déterminer précisément les vitesses d'évolution du processus.

L'enregistrement d'un spectre d'absorption transitoire demande une source spectroscopique couvrant l'ensemble du domaine spectral à analyser et ayant une durée picoseconde comparable à celle de l'impulsion excitatrice. Pour ceci, les différents auteurs utilisent un continuum spectroscopique obtenu par focalisation dans une cuve d'eau ou d'eau lourde, d'une partie de l'impulsion laser picoseconde. Il en résulte par effet non linéaire la production d'un spectre large, très modulé, pouvant servir comme source spectroscopique, à condition d'utiliser une méthode de double faisceau pour s'affranchir des fluctuations tir à tir.

Le principe de la génération d'un continuum sera présenté dans le cadre de la spectroscopie femtoseconde § 3.5.1.

Le principe de la spectroscopie picoseconde utilise la technique de l'excitation et de l'impulsion test retardée. Une impulsion lumineuse picoseconde intense photodissocie l'échantillon, une deuxième impulsion (impulsion continuum test) analyse alors la modification de spectre induite un instant après. Le retard à l'analyse de cette impulsion continuum est réalisé par le fait qu'elle doit parcourir un chemin légèrement plus long. La modification de cette distance est effectuée par le déplacement d'un prisme ou d'une combinaison de 2 miroirs, avec la correspondance 1mm ⇔ 3.3 ps (dans l'air). L'absorption ou la transmission induite est estimée par comparaison avec l'absorption mesurée <u>avant</u> que l'impulsion excitation arrive (figure 21).

Le rapport signal/bruit est amélioré en accumulant plusieurs tirs laser pour un retard donné. L'accumulation n'est possible que si l'échantillon a recouvré son état fondamental d'un tir à l'autre. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne donne pas l'information cinétique en <u>un seul</u> tir laser. Ceci est particulièrement crucial dans le cas de système à faible taux de répétition.

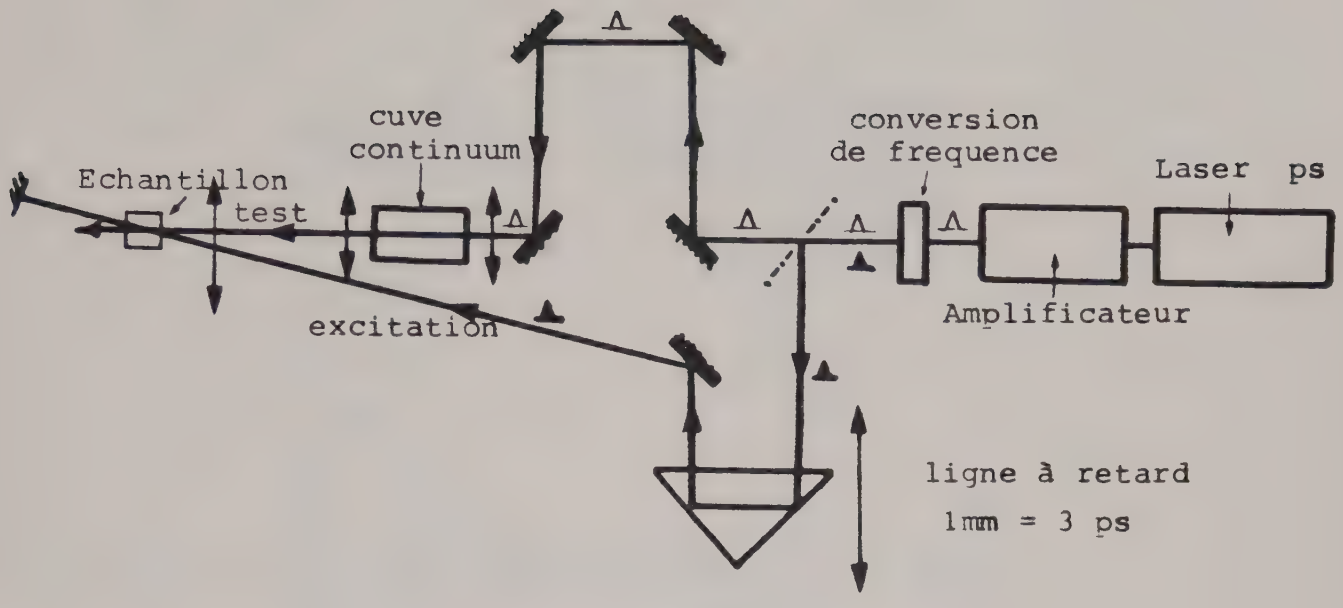


Figure 21 Principe de la spectroscopie picoseconde

Pour pallier cet inconvénient, la technique des " échelons " en transmission a été introduite (Topp et coll. 1971). Elle n'a d'intérêt que dans les systèmes à faible taux de répétition, où une dérive à long terme est suspectée.

Les échelons sont constitués de plaques de verre qui transforment une impulsion continuum en un train d'impulsions (fig. 22), permettant un échantillonnage temporel avec un pas Δt fonction de l'épaisseur de chaque plaque.

Avec ce système on obtient pour le système en réflexion :

$$\Delta t = 2d \cos \theta / c$$

avec d : épaisseur de l'échelon

θ : angle d'incidence

c : vitesse de la lumière

et par le système en transmission ;

$$\Delta t = d \left[(n^2 - \sin^2\theta)^{1/2} - \cos \theta \right] / c$$

si n est l'indice de réfraction du verre, mais attention à l'effet de la dispersion de la vitesse de groupe !

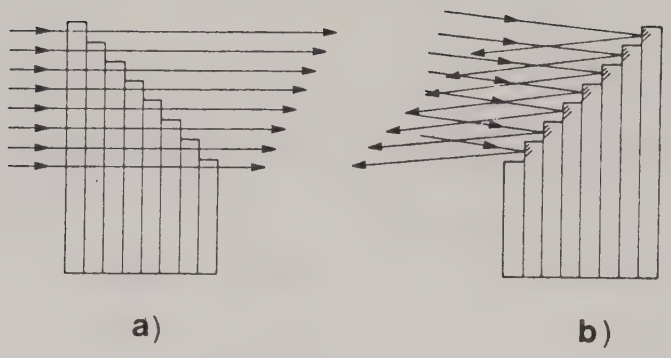


Figure 22 La technique mono-impulsionnelle par l'utilisation des échelons

a) en transmission

b) en réflexion

2.4.2. Bilan des données de la littérature

Si l'on fait exception du travail préliminaire Shank et coll.(1976) les premiers travaux de spectroscopie picoseconde des hémoprotéines sont apparus en 1978(Green et coll., Noe et coll.). Dans le seul domaine de la spectroscopie d'absorption picoseconde des hémoprotéines, on compte au moins 15 articles depuis 4 ans. Les deux équipes ayant la plus grande production dans ce domaine sont celles de Hochstrasser à Philadelphie (H) et de Rentzepis aux Bell Laboratories,Murray Hill (R). Ces deux équipes utilisent la technologie des lasers solides : laser néodyme-verre délivrant des impulsions de 8 ps, ou laser néodyme-Yag, produisant des impulsions de 25 ps.

Nous avons, pour notre part, fait le choix de la résolution subpicoseconde dès 1976, ce qui nous a contraint à réaliser une avancée technologique se révélant productive dans le domaine des hémoprotéines à partir de 1980.

Nous n'exposerons pas dans ce paragraphe nos propres travaux qui font l'objet des chapitres 3 et 4.

1976 Shank et coll. ont été les premiers à s'intéresser à la photolyse de HbO_2 et de HbCO dans le domaine subpicoseconde. Ils ont utilisé des impulsions de 0.5 ps à 615 nm provenant d'un laser à colorant à blocage de modes passif. L'excitation et le test de l'échantillon étaient réalisés avec des impulsions à la même longueur d'onde et à un taux de répétition de 10 kHz. Le principal inconvénient de cette méthode est la présence d'un artefact dû à un effet de cohérence entre les 2 impulsions (figure 23).

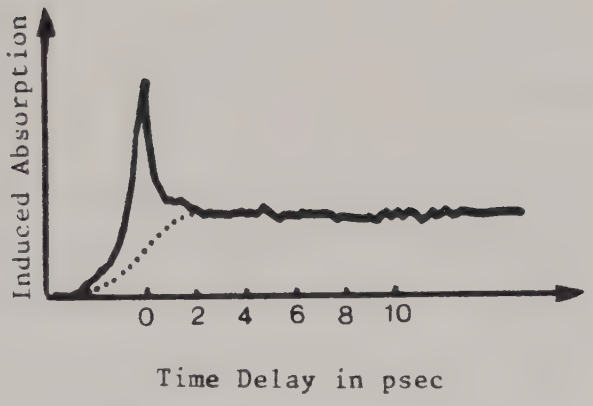


Figure 23 : Absorption induite à 615 nm après photoexcitation de HbCO. Noter l'artefact provoqué par un effet de cohérence (d'après Shank et coll., 1976).

Dans le cas de HbO_2, ils observent une cinétique similaire pour l'absorption induite, suivie d'une phase de relaxation ayant une constante de temps de 2.5 ps. Ce phénomène est interprêté comme révélant un état excité non photolysé.

En conclusion, leurs résultats sont analysés en termes de rendement quantique de photodissociation, la différence entre HbCO et HbO_2 étant la conséquence d'une cinétique de dissociation beaucoup plus rapide de HbCO.

1978(R) Noe et coll.(1978) ont étudié la photodissociation de HbCO en utilisant des impulsions de 6 à 9 ps à 530 nm provenant d'un laser au Néodyme-verre. La cinétique de photodissociation a été mesurée en suivant les modifications d'absorbance entre 0 et 300 ps dans la bande de Soret à la seule

longueur d'onde de 440 nm. Ces auteurs donnent une cinétique de dissociation de 11 ps avec aucune phase de recombinaison entre 48 et 300 ps.

Ils proposent que la durée de vie de 11 ps, beaucoup plus importante que la valeur de 0.5 ps donnée par Shank et coll., est le fait d'une excitation à un niveau supérieur produisant des transitions non radiatives avant d'atteindre l'état fondamental de Hb.

1978(H) Les premiers spectres de différence picosecondes ont été enregistrés par Green et coll.(1978) pour HbCO et HbO_2. Ces auteurs ont utilisé un laser néodyme-verre délivrant des impulsions de 8 ps à 353 nm (3ème harmonique) et à 530 nm (2ème harmonique). L'impulsion test est une impulsion continuum permettant l'enregistrement à chaque tir d'un spectre transitoire de 50 nm de large centré à 420 nm ou à 560 nm.

De l'analyse des spectres transitoires à 8,20 et 680 ps ces auteurs ont déduit que : i) le photoproduit de HbCO et HbO_2 apparaît en moins de 8 ps et possède un spectre ressemblant à celui de l'hémoglobine Hb deoxy, mais très élargi.

ii) la recombinaison du CO et de O_2 avec le groupe hémique représente, à 680 ps, moins de 10 et 20% respectivement des molécules initialement dissociées.

Ils proposent un processus multiphonique comme cause probable de l'élargissement du spectre transitoire. Utilisant un diagramme des niveaux électroniques possibles, ils donnent les niveaux $^3T_1$ de HbCO et ^3CT dans HbO_2, comme candidats pour un tel processus. Il faut noter que leur énergie d'excitation est de 250 µJ.

1979(R) Les cinétiques de photodissociation de MbCO et de MbO_2 ont été mesurées par Eisert et coll.(1979) en suivant l'évolution de l'absorbance dans la bande de Soret à diverses longueurs d'onde. Ils concluent que la photodissociation a lieu en moins de 8 ps et que les changements d'absorbance sont proches de ceux que l'on obtient à l'équilibre. Ils observent d'autre part, une phase de relaxation dans MbCO, qui représente 20 $\pm$ 5% du signal initial et possède une durée de vie de 125 $\pm$ 50 ps. Cette phase n'existe pas dans MbO_2. Ce groupe propose que la phase de relaxation dans

MbCO représente une transition état triplet-état quintuplet de Mb en relation avec des changements structuraux de la poche de l'hème.

1980(H) Les processus photolytiques dans HbO_2 ont été réexaminés dans HbO_2 et HbCO par le groupe Hochstrasser, en utilisant une excitation à 530 nm (Chernoff et coll. 1980). Pour HbCO ils mesurent un spectre différentiel moins élargi que dans leur travail précédent (Greene et coll. 1978) et très semblable au spectre de différence à l'équilibre, excepté un décalage de + 2.5 nm. Ils expliquent cette différence avec leur premier travail par le changement de longueur d'onde d'excitation (530 nm au lieu de 353 nm).

Ils confirment l'absence de phase de recombinaison subnanoseconde pour HbCO. Par contre pour HbO_2 ils observent une phase de recombinaison dite géminée, représentant 40% du signal initial, avec une durée de vie de 200 $\pm$ 70 psec. L'espèce initialement dissociée est caractérisée par un spectre de différence très élargi qui relaxe en 90 ps, vers un spectre ΔA proche de celui à l'équilibre mais décalé de + 4.5 nm. Ce groupe conclue que le rendement quantique faible dans la dissociation de HbO_2 est essentiellement le fait de processus de relaxation vers des états non réactifs. Dans ce papier, ces auteurs confirment que la cinétique de dissociation est plus rapide que 6 ps.

1981(R) Les cinétiques de dissociation dans MbCO et MbO_2 ont été mesurées en analysant l'évolution des absorbances à 420 et 440 nm, après excitation à 530 nm ou à 355 nm(Reynolds et coll. 1981). Leurs résultats indiquent que, indépendamment de la longueur d'onde d'excitation, l'espèce ligandée disparaît en moins de 4 ps, alors que l'espèce non ligandée est formée avec une constante de temps propre de 11 ps. Ceci implique la présence d'une espèce intermédiaire ayant une durée de vie de 7 à 10 ps.

Aucun spectre n'est donné et,en particulier,le domaine spectral où cet intermédiaire absorbe n'est pas révélé. Ils proposent un rendement quantique de dissociation pour MbCO relatif à celui de MbO_2 à 30 ps de 9.5 $\pm$ 2 ($\frac{\Phi MbCO}{\phi MbO_2}$). Ceci implique que la différence des rendements quantiques statiques entre MbO_2 et MbCO, a son origine dans la présence d'états excités ayant des durées de vie égales ou inférieures à 1-2 ps.

1981(H) Les spectres d'absorption transitoires de Mb, MbCO et MbO_2 ont été résolus entre 3.3 ps et 100 ps après l'excitation à 353 nm. Pour MbCO, la disparition de la bande de Soret ligandée et l'apparition de la Soret déligandée sont instantanées, alors que dans MbO_2 il existe une espèce ayant une durée de vie d'environ 12 ps absorbant à 455 nm et responsable de l'élargissement initial du spectre ΔA.

Il n'existe pas de recombinaison subnanoseconde dans MbCO et la valeur maximum pour MbO_2 est de 15%. A 40 ps les spectres de différence sont proches de ceux à l'équilibre, à l'exception d'un décalage de + 3nm. On notera que la plupart de ces résultats sont en contradiction avec ceux du groupe Rentzepis (1981 R).

1982(R) Pour la première fois ce groupe donne des spectres de différence picosecondes (Reynolds,1982). Ce groupe révèle que les spectres ΔA 200 ps après excitation à 532 nm, avec des impulsions de 25 ps, sont identiques aux spectres à l'équilibre. Il montre par ailleurs que les spectres ΔA pour MbCO sont identiques à 20 K et à 260 K.Ces auteurs concluent que pour un temps inférieur ou égal à 1ns, le ligand reste dans la poche de l'hème.

1982(H) Le groupe Hochstrasser donne pour la première fois des spectres
1983(H) transitoires après photodissociation de la nitrosylhémoglobine (HbNO). La cinétique de photodissociation apparaît limitée par la durée de leur impulsion, comme pour tous les autres ligands . Ils révèlent d'autre part une double phase de relaxation 17 ps et $\sim$ 100 ps qu'ils interprétent comme deux processus de recombinaison géminée.

1983(R) Signalons un article de revue par Rentzepis dans Nature, qui reprend les résultats mentionnés ci-dessus pour la myoglobine ligandée.

En conclusion de ces travaux, il apparaît évident que les deux groupes H et R utilisant des techniques similaires n'aboutissent pas aux mêmes résultats, donc pas aux mêmes conclusions. Il faut noter que seul le groupe Hochstrasser a montré systématiquement les spectres transitoires. Nous mentionnerons § 2.5, le rôle que pourrait avoir une résolution subpicoseconde dans la clarification des processus photolytiques.

2.4.3. L'influence de la longueur d'onde d'excitation

L'influence de la longueur d'onde d'excitation a été évoquée dans l'explication des désaccords entre les deux groupes mentionnés précédemment. Ainsi, bien que Reynolds et coll.(1981) indiquent que leurs résultats de cinétique sont indépendants de la longueur d'onde d'excitation (530 ou 355 nm) , leurs mesures de rendement quantique impliquent que :

$$\Phi^{MbCO}_{355,530} > \Phi^{MbO_2}_{355} \approx 3\,\Phi^{MbO_2}_{530}$$

D'autre part, Eisert et coll.(1979) n'ont pas trouvé de relaxation pendant les 450 ps suivant l'excitation de MbO_2 à 530 nm, alors que Cornelius et coll.(1981) donne une limite supérieure de 15%, 10 ns après excitation à 353 nm.

Il apparaît donc essentiel que ce rôle de la longueur d'onde d'excitation soit examiné dans le domaine femtoseconde, et pour ses implications éventuelles, dans des phases de recombinaison.

2.4.4. Limite de la résolution temporelle

Nous venons de voir que les travaux picosecondes sur les hémoprotéines utilisent des lasers solides. Ceci limite la résolution temporelle à 6-8 ps pour les lasers Néodyme-verre et à 25-30 ps pour les lasers Néodyme-Yag.

Il existe cependant une limite plus gênante dans l'analyse des résultats, de par l'utilisation d'impulsions de durée supérieure au processus étudié. Cette situation favorise en effet l'hétérogénéité dans la répartition initiale des états excités, déligandés ou non, la plupart d'entre eux résultant d'une excitation multiphotonique. Il ne faut donc pas s'étonner des résultats contradictoires de la littérature, la simple modification de l'énergie d'excitation de 50% pouvant entraîner des cinétiques apparentes très différentes, alors qu'en fait ce ne sont pas les mêmes espèces qui sont étudiées.

2.5. INTERET ESCOMPTE D'UNE RESOLUTION SUBPICOSECONDE

Des travaux précédemment exposés, il apparaît, tout au moins dans le cas des oxyhémoprotéines, que le processus photolytique comporte des états intermédiaires à durée de vie picoseconde ou subpicoseconde. Sans pouvoir établir de véritable relation de cause à effet, il semble que les cinétiques picosecondes soient très dépendantes des caractéristiques de

l'impulsion d'excitation (durée, longueur d'onde, énergie). Ces effets non linéaires sont suspectés être la conséquence de processus multiphotoniques.

Anticipant l'existence de réarrangements dans l'environnement de l'hème dans le domaine subpicoseconde, nous avons entrepris dès 1976, la conception et la construction d'un système expérimental capable de résoudre de telles cinétiques. L'idée initiale est que, compte-tenu des périodes de vibration des liaisons de l'atome de Fer, on peut postuler l'existence de cinétiques de déformation dans l'échelle des femtosecondes (50-500 Fs). Ceci est compatible avec les résultats de la dynamique moléculaire. Il est donc du tout premier intérêt de résoudre précisément les premiers événements accompagnant la dissociation du ligand et leur dépendance à la structure protéique environnante. Ceci nécessite la caractérisation cinétique et spectrale des transitions électroniques impliquées dans ces processus initiaux.

D'autre part, nous tenterons d'apporter des arguments dans le débat concernant le mouvement de l'atome de fer, en dehors du plan de l'hème, après dissociation du ligand axial. Rappelons à ce sujet que les résultats de la spectroscopie Raman picoseconde n'ont pas encore apporté une réponse claire. Ils suggèrent cependant un mouvement, au moins partiel, en dehors du plan de l'hème, en moins de 30 ps (Terner 1980, 1981). Cette conclusion provient de l'analyse de la position de la raie Raman à 220 cm^{-1}, or nous avons vu que l'attribution de cette fréquence au mode de vibration Fe-N_{ε} (His F 8) ne fait pas l'unanimité (Desbois 1981).

En tout état de cause, ce mouvement de l'atome de fer, qui peut être considéré comme une fluctuation locale de quelques dixièmes d'Angströms d'amplitude, est un bon candidat à une dynamique femtoseconde. La question est, avec quelle efficacité de couplage, la protéine rigidifie cette fluctuation ?

CHAPITRE III

LE SYSTEME EXPERIMENTAL

3.1. INTRODUCTION ET HISTORIQUE DU MONTAGE

Nous avons vu précédemment que la technologie des lasers solides limite la résolution temporelle à une valeur de 6-8 ps. C'est pourquoi nous avons entrepris dès 1976, la construction d'un système picoseconde utilisant la technologie des lasers à colorant à blocage de modes passif.

A cette époque, Shank et coll.(1975) venaient de réaliser le premier laser subpicoseconde en utilisant cette technique. Un oscillateur similaire était opérationnel dès 1977 dans notre laboratoire et est resté en fonctionnement jusqu'en 1982. Le principe est le suivant(Antonetti et coll. 1978):

- un laser continu à argon ionisé pompe un colorant (Rhodamine 6 G), le blocage de modes étant assuré par un absorbant saturable (DODCI* additionnée de vert de malachite).

Ce laser comporte des miroirs à coefficient de réflexion maximum et nécessite donc un cristal acousto-optique pour extraire une partie de l'énergie de la cavité.

La fréquence de récurrence est donc limitée par la fréquence d'extraction. De ce fait, le taux de répétition qui est de 7×10^7 Hz dans la cavité, est réduit à 5×10^5 Hz (au maximum) à l'extérieur de la cavité. Ces impulsions possèdent une durée de 0.5 ps à 615 nm et une énergie de l'ordre du nanojoule (10^{-9} J).

Des impulsions subpicosecondes, ayant des caractéristiques semblables,peuvent aussi être obtenues avec des lasers à colorant à pompage synchrone (Levine et Heritage 1979).

Cependant, la réalisation d'expériences de spectroscopie d'absorption nécessite des puissances de l'ordre du gigawatt, en particulier pour créer une lumière blanche subpicoseconde(ou continuum).

Pour atteindre de telles puissances, il est nécessaire d'amplifier les impulsions subpicosecondes issues de l'oscillateur. Nous devons atteindre un facteur d'amplification de 10^6.

* DODCI : 3,3' - diethyloxadicarbocyanine iodide

Le premier montage d'amplification a été réalisé en 1979 par C.V. Shank et son groupe (Shank et coll.,1979) aux Laboratoires Bell à Holmdel. La même année nous avons construit un système équivalent, initialement en utilisant une source à pompage synchrone (Martin et coll.,1979), puis l'oscillateur à blocage de modes passif (Martin et coll. 1980 a, 1980b, Migus et coll. 1980).

Depuis lors, le système expérimental n'a cessé d'évoluer, en particulier après l'installation d'un nouveau type d'oscillateur dit C P M pour "colliding pulse mode-locking " produisant des impulsions d'une durée inférieure à 100 femtosecondes (100×10^{-15} s). Nous développerons la description de ce système dans le paragraphe suivant, ainsi que les méthodes permettant de caractériser ces impulsions.

L'amplification d'impulsions femtosecondes d'un facteur 10^7, sans trop altérer leurs caractéristiques temporelles, fait surgir des problèmes spécifiques à ce domaine et tout à fait négligeables pour des impulsions picosecondes.

Nous décrirons, dans ce chapitre, la chaîne d'amplification, les milieux amplificateurs et les techniques de compensation de l'élargissement des impulsions dus à la dispersion de la vitesse de groupe des impulsions dans les milieux réfringents.

La réalisation d'une source femtoseconde puissante n'est que la première étape dans la construction d'un système de spectroscopie femtoseconde autour duquel une nouvelle méthodologie a été développée.

Nous présenterons en détail les techniques de spectroscopie femtoseconde, la génération et l'utilisation du continuum dans des expériences du type excitation-test avec ligne de retard optique, les systèmes de détection associés et le traitement du signal ainsi que la procédure expérimentale et les précisions obtenues.

Nous insisterons sur une nouvelle technique que nous avons récemment développée permettant d'obtenir des impulsions femtosecondes ayant une puissance de l'ordre du gigawatt et accordable en longueur d'onde dans tout le domaine du visible.Nous avons pu, ainsi, tester l'influence de la longueur d'onde d'excitation sur le processus photolytique et définitivement répondre aux problèmes des cinétiques de dissociation et de relaxation supposées dépendantes de cette longueur d'onde.

Ainsi, nous avons utilisé une excitation à 580 nm, c'est à dire juste au-dessus du seuil de dissociation, d'après les calculs de Loew et coll.(1982 a.b).

3.2. LA SOURCE FEMTOSECONDE

3.2.1. Le laser en anneau

Plusieurs types d'oscillateurs sont capables de produire des impulsions optiques dans le domaine subpicoseconde. Au cours de ce travail, notre source a évolué pour devenir le système C P M .

C'est cette dernière configuration, dite en anneau (ring laser) que nous présentons ici.

Cette configuration consiste en une série de miroirs formant une cavité en anneau, et comportant seulement deux éléments essentiels en deux points focaux : un jet de Rhodamine 6 G pour le gain, et un jet d'absorbant saturable pour le blocage de modes. La simplicité de ce système, en particulier l'absence d'éléments dispersifs , explique sa capacité à engendrer des impulsions aussi brèves que 80 Fs (8×10^{-14}s).

Schématisé figure 24, cet oscillateur est pompé par un laser à argon ionisé continu délivrant 5 à 7 watts à 514,5 nm. Le laser comprend deux sous-cavités : la première est destinée à la focalisation du laser de pompe (ν_o) sur le milieu amplificateur (jet de rhodamine 6 G), l'autre à la focalisation sur le jet d'absorbant saturable (DODCI) servant à bloquer les modes de la cavité. Le miroir de sortie est partiellement réfléchissant (T = 6%). La sélection spectrale est principalement réalisée par le revêtement multidiélectrique des miroirs de repli. En conséquence, la longueur d'onde centrale de l'impulsion (620 nm) est déterminée par la combinaison du spectre de gain de la rhodamine, du spectre d'absorption de la DODCI, et du spectre de réflexion des différents miroirs. Ce laser n'est donc pas accordable.

Tous les éléments dispersifs épais, introduisant des décalages temporels entre les différentes composantes spectrales de l'impulsion (d'où élargissement temporel), ont été supprimés : prisme de sélection spectrale, cristal acousto-optique d'extraction.

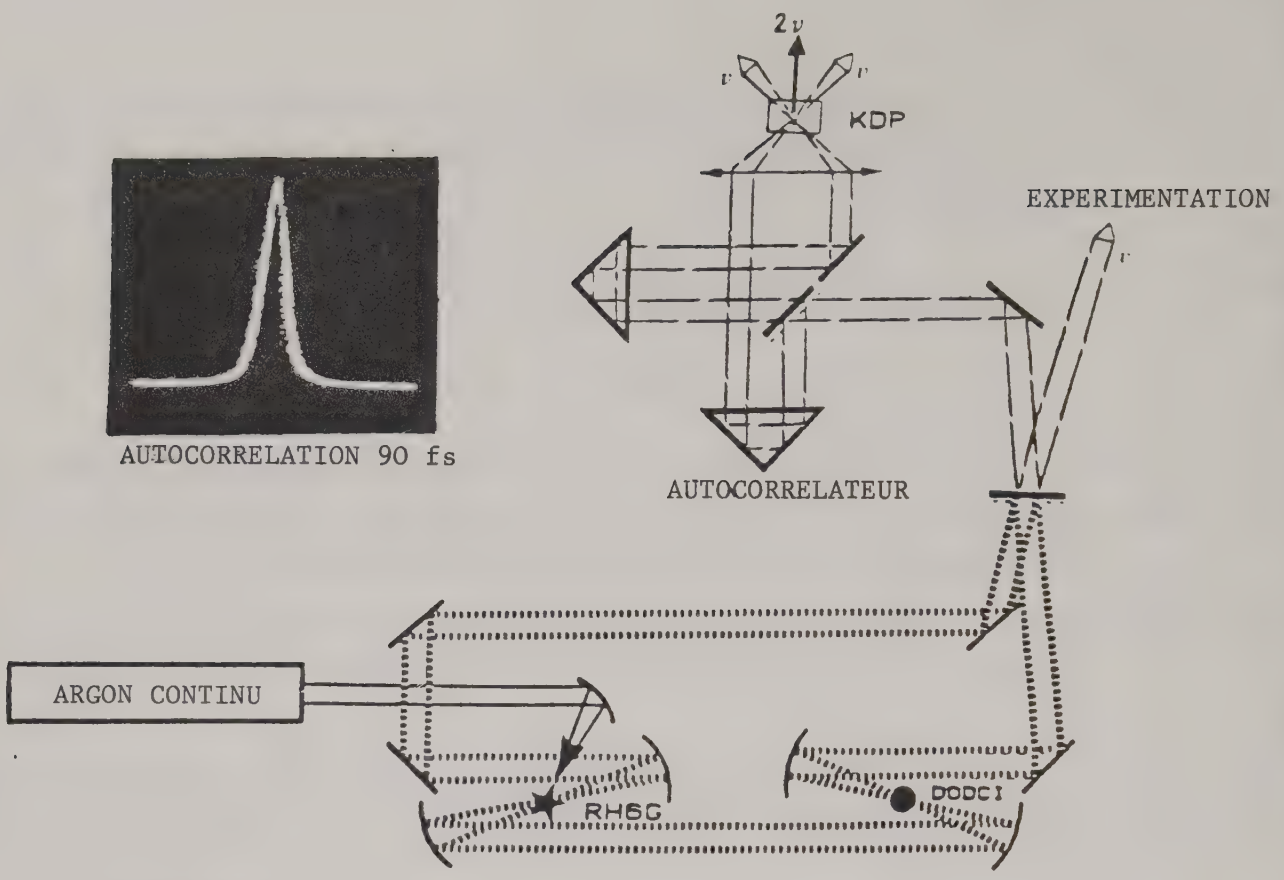


Figure 24 Schéma du laser en anneau

D'une part, on remarquera que la focalisation du faisceau laser-Argon se fait par un miroir (R=100 mm) différent de celui de l'oscillateur (sous-cavité Rh 6 G, R = 100 mm, revêtu pour une réflexion maximum dans la bande d'émission de la rhodamine). Les rayons de courbure pour la sous-cavité DODCI sont R= 50 mm. La distance entre les deux jets est de l'ordre du quart de la longueur de la cavité, soit 95 cm. La fréquence de récurrence des impulsions à la sortie est donc d'environ 80 Mhz. Remarquons figure 24, partie supérieure, le principe de la mesure en temps réel de la durée des impulsions, sujet que nous aborderons plus loin.

Deux trains d'impulsions transitent en sens inverse dans la cavité et se croisent (après s'y être synchronisés) dans l'absorbant saturable dont l'épaisseur a été réduite au maximum (quelques μm). On remarque le prolongement des caractéristiques du laser de Ruddock et Bradley(1976). En effet, le fait de disposer l'absorbant saturable à une extrémité de la cavité avait pour effet de faire interférer l'impulsion avec sa propre réflexion dans l'absorbant saturable , tandis que dans le laser en anneau, ce sont deux impulsions " indépendantes " qui interfèrent. Le recouvrement des deux impulsions dans la durée des impulsions émises qui ne peuvent avoir une longueur inférieure au chemin optique dans le jet

(30 microns pour 0,1 picoseconde). En effet, les pertes par absorption deviendraient alors trop importantes. Cette corrélation étroite entre l'épaisseur du jet et la durée de l'impulsion nous a conduits à élaborer des techniques de fabrication de buses nouvelles, destinées à obtenir les écoulements les plus fins possible (15 à 20 µm).

De plus, le réseau d'interférences créé dans le jet par les deux impulsions engendre des phénomènes d'interférence à 4 ondes (conjugaison de phase). Une partie de l'impulsion est " réfléchie " avec inversion de la phase. Son front arrière devient front avant, et en interférant avec l'onde incidente, produit une symétrisation de la forme des impulsions.

3.2.2. Caractérisation des impulsions par autocorrélation

On contrôle en temps réel la durée de l'impulsion dans un autocorrélateur (figure 25). Il s'agit d'un interféromètre du type Michelson modifié, avec un bras vibrant à 20 Hertz. Les deux faisceaux sont mélangés dans un cristal de KDP (e = 0,1 mm) pour engendrer, par doublage de fréquence, un signal U.V. quand les deux impulsions sont synchrones. La largeur à mi-hauteur de la figure d'autocorrélation donne, après correction par un coefficient dû à la forme supposée de l'impulsion, la durée de cette dernière.

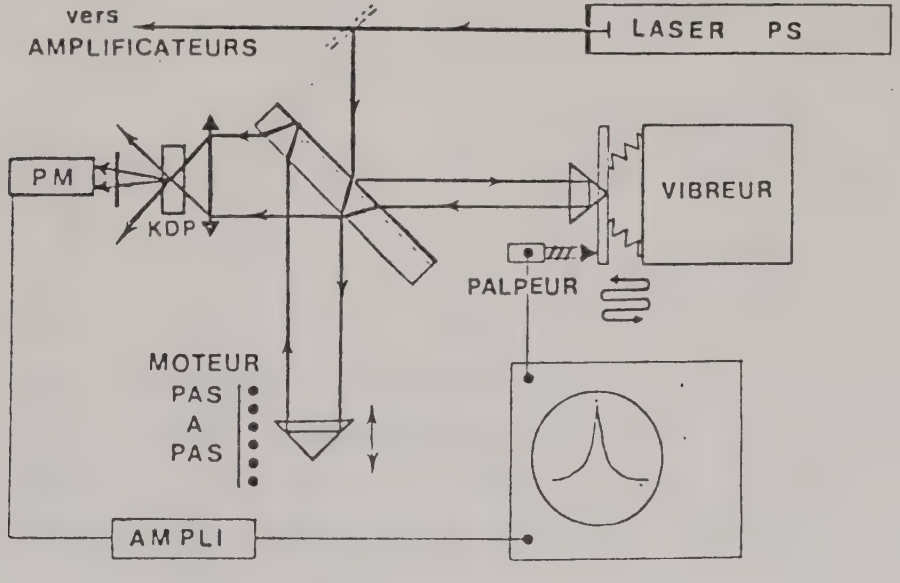
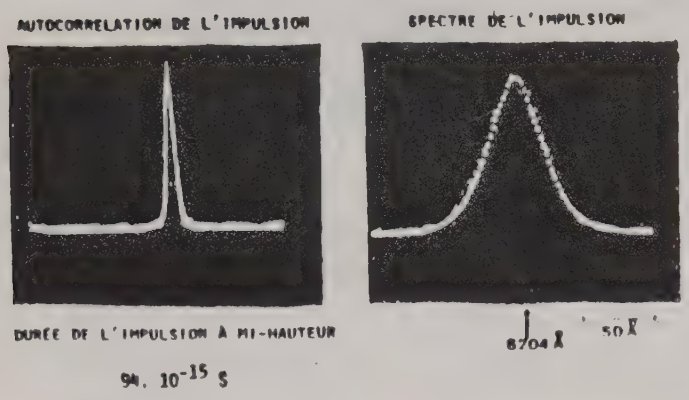


Figure 25 : schéma détaillé de l'autocorrélateur temps réel.
P.M. : photomultiplicateur
KDP : cristal doubleur de fréquence (potassium dihydrogen phosphate).

La figure 26 montre une telle autocorrélation, ainsi que le spectre correspondant observé sur un analyseur optique multicanal placé derrière un spectrographe.



Les impulsions les plus courtes obtenues ont une durée de 70 femtosecondes, leur durée est très dépendante de l'épaisseur du jet d'absorbant saturable.

La théorie des lasers à blocage de modes passif, indique que, dans notre cas, la forme des impulsions s'apparente à une fonction (sécante^{2}hyperbolique(Haus et coll. 1975).

Figure 26 Autocorrélation et spectre de l'impulsion.

Sur la figure 27, nous avons reporté la fonction d'autocorrélation de notre impulsion, ainsi que celles de fonctions - exponentielle
- sécante hyperbolique (au carré)

En utilisant cette dernière fonction, on constate un très bon ajustement avec la courbe expérimentale.

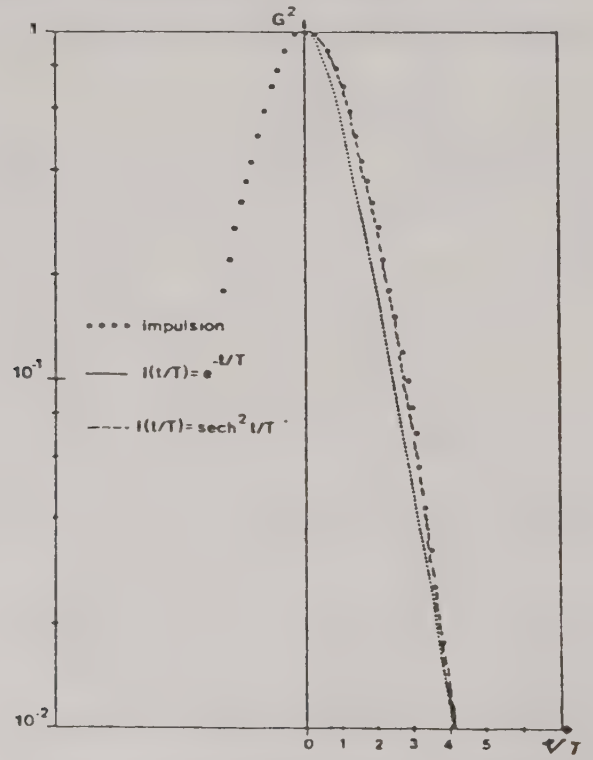


Figure 27 Autocorrélation expérimentale et meilleurs ajustements pour 2 formes d'impulsions.

Or, dans le cas d'une fonction sécante hyperbolique, si $\Delta\nu$ est la largeur à mi-hauteur de la fonction transformée de Fourier, on sait que: (Sala et coll. 1980)

$$\Delta\nu \,.\, \Delta t = 0.315$$

Nous pouvons vérifier ceci par l'analyse des valeurs mesurées figure 26 :

$\Delta t_{1/2}$ = 94 Fs (en utilisant le facteur correctif de 1.55 pour obtenir la durée réelle de l'impulsion à partir de la mesure de l'autocorrélation (par une $sech^2$)

$\Delta\lambda_{1/2}$ = 43 Å

$\lambda_{centrale}$ = 6204 Å

- calcul de $\Delta\bar{\nu}$:

$6204 - \frac{43}{2} = 6182.5$ Å $\rightarrow$ 16174.7 cm^{-1}

$6204 + \frac{43}{2} = 6225.5$ Å $\rightarrow$ 16063.0 cm^{-1}

soit $\Delta\bar{\nu}$ = 111,7 cm^{-1}

- calcul de $\Delta\nu$

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = c\ (cm.s^{-1}) \times \frac{1}{\lambda(cm)} = c \times \nu\ (cm^{-1})$$

$$\Delta\nu = 111.7 \times 3 \times 10^{10} = 3{,}351 \times 10^{12}\ Hz$$

d'où $\Delta t.\Delta\nu = 94 \times 10^{-15} \times 3{,}351 \times 10^{12} = 3{,}14994 \times 10^{-3} = 0{,}315$

Ainsi le spectre de l'impulsion est bien le spectre de Fourier.

Dans le premier montage réalisé par le groupe de Shank, la sélection spectrale était améliorée par une membrane mince (2µm) placée dans la cavité et faisant office de Fabry-Pérot. Nous n'avons pas retenu cette solution, la membrane à la longue se déteriorant et étant une source d'instabilités. Nous avons préféré la solution des revêtements multidiélectriques pour des miroirs plans, avec une combinaison de sélections spectrales appropriées.

La figure 28 donne l'autocorrélation et le spectre de l'impulsion pour deux configurations :

a) 2 miroirs R_{max} à 612 nm

b) 3 miroirs R_{max} à 612 nm

C'est cette configuration qui a été retenue, car c'est celle qui donne une impulsion limitée par la transformée de Fourier de son spectre.

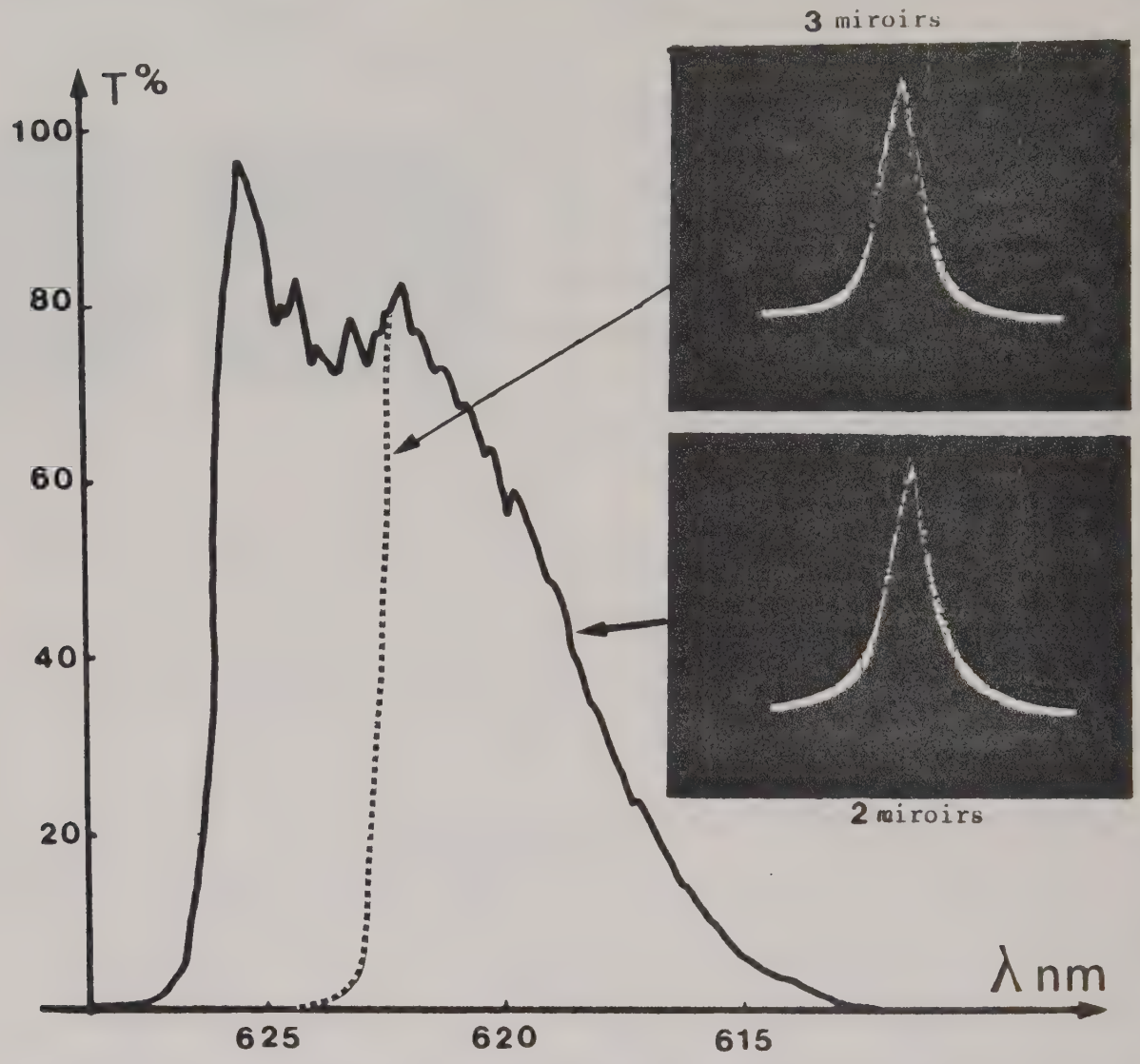


Figure 28 : Autocorrélations et spectres des impulsions en fonction de la configuration des miroirs. Avec 2 miroirs 612 nm : Δt=75 Fs.

3.3. AMPLIFICATION DES IMPULSIONS FEMTOSECONDES

L'oscillateur délivre des impulsions à 80 Mhz, mais avec une énergie par impulsion de 100 x 10^{-12} J. Pour réaliser un système utilisable en spectroscopie d'absorption, il faut atteindre une énergie de l'ordre de 10^{-3}J. Ceci est du rôle de l'amplificateur. La conséquence sera une fréquence de récurrence abaissée à 10 Hz.

3.3.1. Configuration et milieux amplificateurs

Le schéma de principe est donné figure 29. L'oscillateur délivre des impulsions de 100 Fs et 0.1 nJ. Un laser déclenché Nd^{3+}-YAG doublé en fréquence est synchronisé à ce train d'impulsions à 500 ps près. Le taux de répétition du laser Nd^{3+}-YAG est de 10 Hz, il vient pomper 4 étages de colorants (1,2,3 et 4 figure 29).

Nous allons développer cette technique d'amplification, ce travail ayant constitué un préalable aux expériences de spectroscopie femtoseconde des hémoprotéines

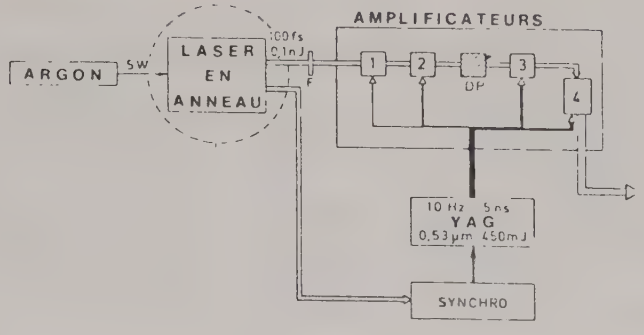


Figure 29 : schéma de principe de l'amplificateur

L'amplification d'impulsions femtosecondes représente en effet un travail original, surtout à l'époque où ce travail a débuté.

Citons les spécificités de l'amplification d'impulsions femtosecondes dans des colorants pompés par laser déclenché picoseconde:

1. L'amplification dépend de la population excitée en régime permanent, telle qu'elle est déterminée par l'équilibre entre l'excitation des molécules par le pompage et les pertes par l'émission spontanée amplifiée(ESA). Elle est donc faible (Migus et coll. 1982).

2. L'amplification distord les impulsions en régime saturé (Migus 1980)

3. L'amplification femtoseconde subit un élargissement temporel par dispersion de la vitesse de groupe. Cependant cet effet peut être en grande partie compensé, nous y reviendrons plus loin.

Le point 1 est trop technique pour être développé ici.

Retenons les résultats :

a) Une amplification importante (10^7)ne peut être atteinte que dans une succession d'étages amplificateurs. Quatre sont nécessaires pour atteindre le millijoule en sortie.

b) La section transverse du faisceau amplifié doit augmenter dans son parcours, pour passer d'un diamètre de 100 µm dans le premier étage, à un diamètre de 0.4 cm dans le quatrième.

c) La nature des colorants et leur concentration doivent être adaptées. Ainsi le premier étage contient du Kiton Red (620 Exciton) (sulforhodamine B) en solution, à la concentration de 5×10^{-4} M/ℓ, dans l'eau contenant 2% d'Amonix L.O. Les 3 autres étages contiennent de la sulforhodamine 101 (640 Exciton) aux concentrations successives de 3×10^{-4} M/ℓ et 10^{-5} M/ℓ.

d) L'énergie de pompage doit être répartie entre les différents étages. Respectivement 5%, 10% et 20% de 400 mJ à 0.530 nm pompent les trois premiers étages, dans une configuration transverse. Le reste, soit 260 mJ, pompe longitudinalement un étage de sortie de 10 cm de long, afin d'améliorer le mode à la sortie (figure 30)

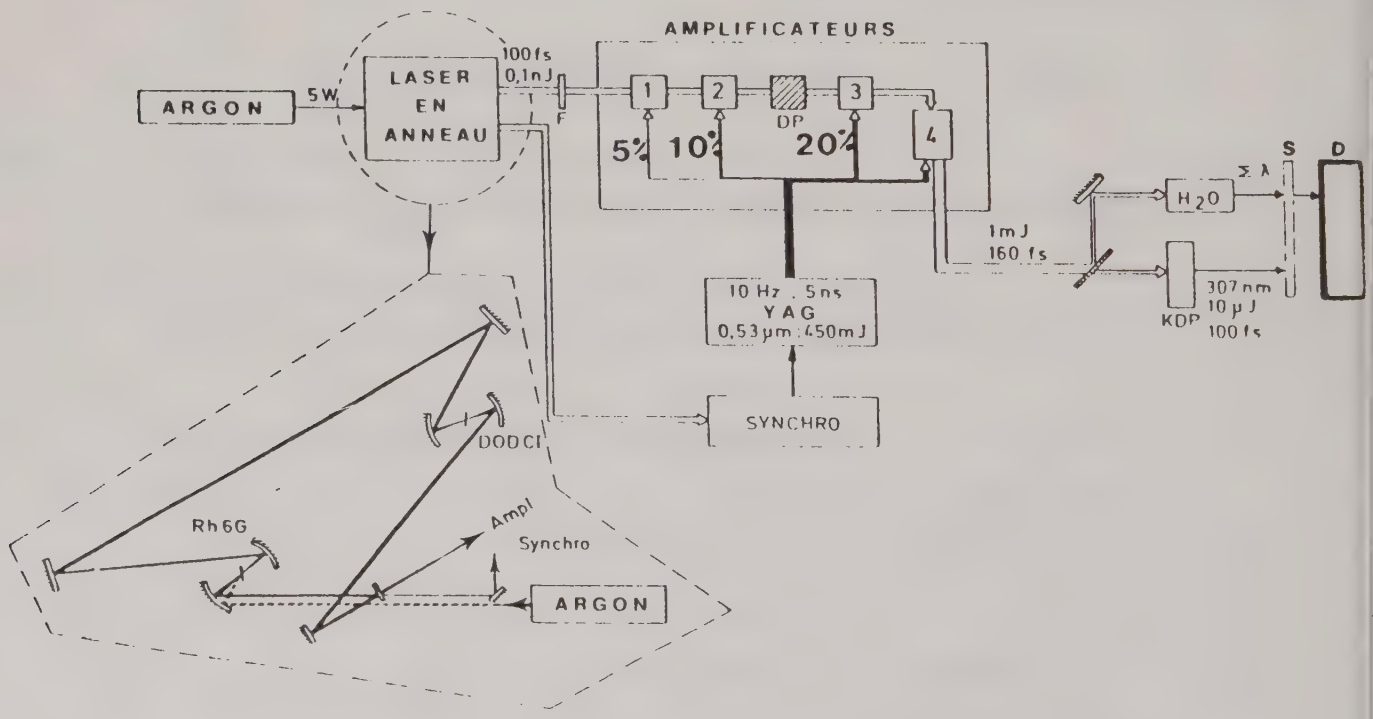


Figure 30 : Configuration de l'ensemble oscillateur amplificateur

e) Les étages doivent être isolés les uns des autres afin d'éviter leur couplage. Ceci est réalisé grâce à des jets d'absorbant saturable (vert de Malachite). Leur effet est double : la fluorescence parasite est absorbée alors que l'impulsion femtoseconde sature le milieu qui relaxe en 1.5 ps après son passage,en restaurant l'opacité, et d'autre part, le front avant de l'impulsion devient plus abrupt, grâce au processus de saturation.

Forme de l'impulsion et rôle de l'absorbant saturable

Parallèlement à l'importance du gain, il faut noter que l'amplification peut rallonger la durée de l'impulsion. La distorsion dépend fortement de la forme de l'impulsion d'entrée, plus particulièrement de la raideur du front avant, de l'énergie de l'impulsion d'entrée et de l'énergie stockée rapportées au niveau de saturation. Dans la figure 31, nous voyons la modification de la forme temporelle d'entrée (ligne continue) pour un niveau de stockage égal à 10 fois la saturation, et pour des énergies d'entrée normalisées variant de 10^{-4} à 1 fois la saturation (de droite à gauche), et ceci pour des formes d'entrées respectivement gaussienne, cosécante hyperbolique carrée, ou front avant en aile d'exponentielle.

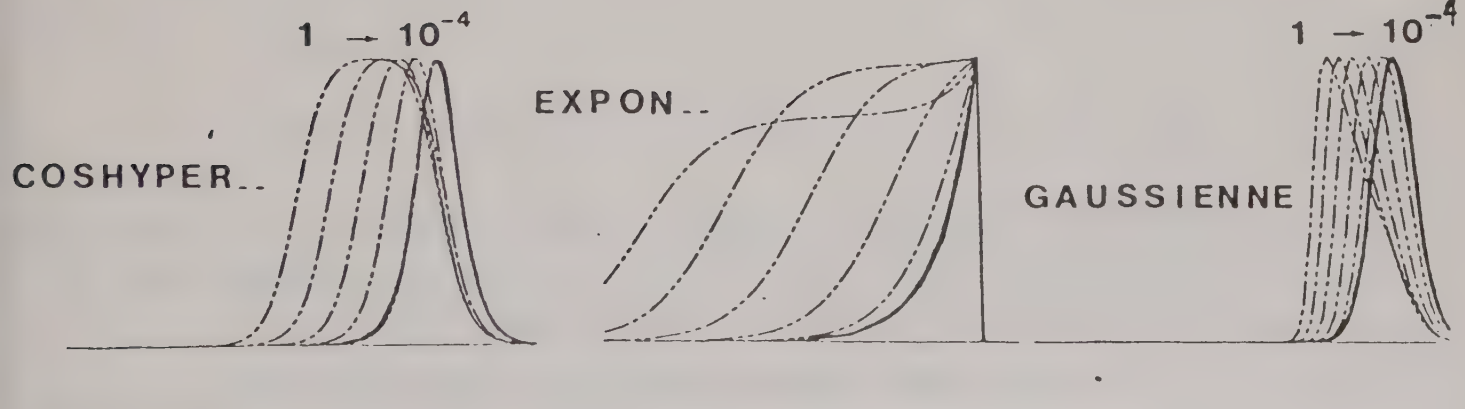


Figure 31 : Déformation de l'impulsion dans diverses conditions d'amplification

Comme on peut le voir, l'amplification du front avant produit un élargissement temporel. Pour éviter ce phénomène, nous avons dû interposer avant les étages d'amplification un jet d'absorbant saturable qui a pour rôle de raidir ce front avant. Nous avons résolu numériquement (méthode de Runge Kutta d'ordre 5) les équations couplées de l'impulsion à travers un absorbant saturable. Dans la figure 32, nous présentons comment une impulsion de forme cosécante hyperbolique carrée, de durée 0.5 picoseconde traversant un absorbant saturable dont le temps de relaxation est 1.5 picoseconde, voit son front avant se modifier. Nous avons fixé la concentration pour que la transmission initiale soit $e^{-8.5} \simeq 2.10^{-4}$. En fonction de différentes densités d'énergie d'entrée (respectivement 25, 50, 100 et 200 en σ_ℓ^{-1}), on voit que le front avant est modifié, sans toutefois trop

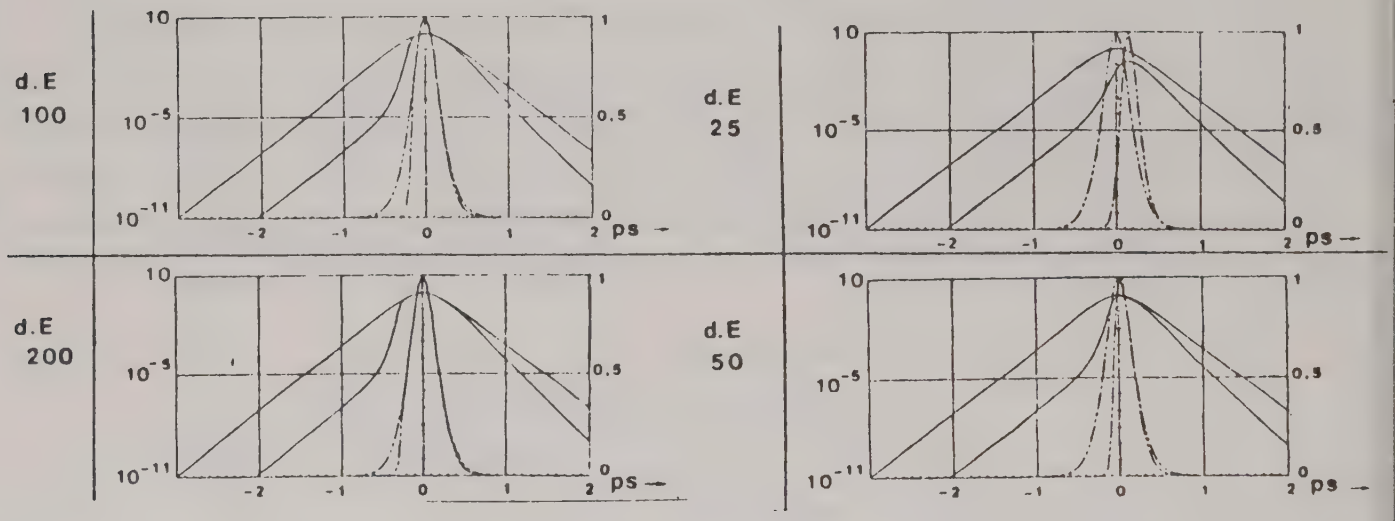


Figure 32 : Etude théorique. Effet de l'absorbant saturable.

affecter la transmission résultante (respectivement 10%, 54%, 76% et 88 %). Sur la figure 32, les lignes discontinues représentent les impulsions en linéaire et les lignes continues en unité logarithmique.

Cette étude a démontré l'importance fondamentale d'intercaler des absorbants saturables dans la chaîne d'amplification.

Dispersion linéaire

Nous avons vu qu'une impulsion aussi courte que 100 Fs possède un spectre très étendu, de l'ordre de 50 Å. En se propageant dans divers

milieux tels que l'eau des étages amplificateurs et le verre des optiques, la partie la plus rouge du spectre, qui se propage le plus rapidement, prend de l'avance sur la partie la moins rouge. Ce phénomène, dit " dispersion de vitesse de groupe " correspond au fait que l'indice des milieux matériels varie en fonction des longueurs d'onde.

La figure 33 illustre de façon très démonstrative ce phénomène. Les figures d'autocorrélation de l'impulsion (50% de l'énergie)directement à la sortie de l'oscillateur, fig. 33 a (Δt=85 Fs) et après passage dans 20 cm d'eau pour les 50% restant (Δt=200 Fs) sont présentées. L'eau est pourtant un des milieux liquides les moins dispersifs.

Figure 33 : a) autocorrélation de l'impulsion à la sortie de l'oscillateur (Δt = 85 Fs)

b) autocorrélation après passage dans 20 cm d'eau (Δt=200 Fs)

Nous devrons tenir compte de ce problème de dispersion dans l'analyse des spectres transitoires après photodissociation des hémoprotéines. L'impulsion continuum est en effet très sensible à la dispersion induite par les diverses optiques. Nous allons donc quantifier ce phénomène.

Si ω et $\vec{k}$ sont respectivement la polarisation et le vecteur d'onde de l'onde optique, la vitesse de groupe Vg est donnée par :

$$Vg = \frac{d\omega}{dk} = \frac{d}{dk}\left[\frac{c}{n}k\right] = \frac{c}{n} - \frac{ck}{n^2}\frac{dn}{d\lambda}\frac{d\lambda}{dk}$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide et n l'indice de phase lié à ω et k par :

$$\omega = \frac{ck}{n}$$

Le vecteur d'onde est lui lié à la longueur d'onde λ par :

$$k = \frac{2\pi n}{\lambda}$$

On en déduit que

$$\frac{d\lambda}{dk} = \frac{d}{dk}\left[\frac{2\pi n}{k}\right] = \frac{2\pi n}{k^2} + \frac{2\pi}{k}\frac{dn}{d\lambda}\frac{d\lambda}{dk} = -\frac{2\pi n/k^2}{1-\frac{2\pi}{k}\frac{dn}{d\lambda}}$$

d'où $$\boxed{Vg = \frac{c}{n}\left\{1 - \frac{\lambda}{n}\frac{dn}{d\lambda}\right\}^{-1}}$$

où $Vg = \frac{c}{ng}$ avec ng l'indice de groupe :

$$\boxed{ng = n\left\{1 - \frac{\lambda}{n}\frac{dn}{d\lambda}\right\}}$$

Des formules empiriques, telle la formule de Sellmeier donnent l'indice de phase n en fonction de la longueur d'onde λ(en μm) :

$$n = \left[1 + \frac{A\,\lambda^2}{\lambda^2-\lambda_o^2} + \ldots\right]^{1/2}$$

soit $$n = \left\{1 + \frac{A}{1-x}\right\}^{1/2} \text{ avec } \boxed{x=\left(\frac{\lambda_o}{\lambda}\right)^2}$$

d'où $$\boxed{ng = n + \frac{A\,x}{n}\frac{1}{(1-x)^2}}$$

Pour l'eau on a trouvé comme meilleur ajustement :

$$A = 0.7541 \qquad \lambda_o^2 = 0.01$$

et pour le verre (BK 7).

$$A = 1.263 \qquad \lambda_o^2 = 0.01$$

Ceci doit, en théorie, nous permettre de calculer l'élargissement temporel d'une impulsion donnée, sachant que deux composantes spectrales ω_1 et ω_2 auront un décalage temporel $\Delta\tau$ après un parcours L, tel que :

$$\Delta\tau = L\left[\frac{1}{Vg(\omega_2)} - \frac{1}{Vg(\omega_1)}\right]$$

$$\sim \frac{L}{Vg^2} \left| \frac{dVg}{d\omega} \right| \left| \omega_2 - \omega_1 \right|$$

En fait, l'élargissement d'une impulsion dépend de sa forme temporelle et de son spectre.

Le problème n'est résolvable analytiquement que dans le cas d'une impulsion à enveloppe gaussienne. La méthode est la suivante : on part d'une impulsion gaussienne à la pulsation centrale ω_o, à l'entrée du milieu (Z = O)

$$E\ (\ Z = O,t\ ) = \exp\ (\ -\alpha t^2)\ .\ \exp\ (\ i\omega_o t\ )$$

$$= \exp\ (\ i\omega_o\ ) \int_{-\infty}^{+\infty} F(\Omega)\ \exp\ i\Omega t\ d\Omega$$

où $F(\Omega) = \sqrt{\frac{1}{4\pi\alpha}}\ \exp\ (\ -\Omega^2/4\alpha\ )$

est la transformée de Fourier de l'enveloppe $\exp(\ -\alpha t^2)$.

La composante de E à la fréquence $\omega_o+\Omega$ et à la distance Z est obtenue en multipliant cette composante par le terme de propagation (on suppose les pertes nulles) exp [-ikz] où :

$$k = k\ (\ \omega_o + \Omega\ ) = k\ (\omega_o) + \frac{dk}{d\omega}\Big|_{\omega_o} \Omega + \frac{1}{2}\frac{d^2k}{d\omega^2}\Big|_{\omega_o} \Omega^2 + \ldots$$

De cette façon on obtient :

$$E'(z,t) = \exp\ [\ i(\omega_o t - k_o z\ )\ ]\quad \xi\ (z,t\ )$$

où $\xi\ (z,t)$ est l'enveloppe du champ :

$$\xi(z,t) = \int_{\infty}^{-\infty} d\Omega\ \ F(\Omega)\ \exp\ \{\ i\Omega\ [(t - \frac{z}{Vg}\ ) - a\Omega z\ ]\ \}$$

où on a utilisé les notations :

$$k_o = k(\omega_o)\ ,\ \frac{1}{Vg} = \frac{dk}{d\omega}\quad ,\ a = \frac{1}{2}\ \frac{d}{d\omega}\ (\frac{1}{Vg}) = -\ \frac{1}{2Vg^2}\ \frac{dVg}{d\omega}$$

Substituant $F(\Omega)$ à sa valeur, on trouve que l'enveloppe $\xi(z,t)$ est proportionnelle à :

$$\xi(z,t)\ \sim\ \exp\ [-\ \frac{(t - \frac{z}{Vg})^2\ \alpha}{1+4a^2z^2\alpha^2}\ ]$$

C'est donc encore une gaussienne après un parcours z = L, avec une durée élargie d'un facteur :

$$\sqrt{1 + 4a^2\alpha^2 L^2}$$

et qui se propage à la vitesse de groupe Vg !

Si τ et τ' sont respectivement les durées à mi-hauteur de l'impulsion initiale (z=0) et de l'impulsion finale (z=L) :

$$\tau' = \tau \sqrt{1 + \left(\frac{d^2k}{d\omega^2} L \; 4 \frac{\ell n^2}{\tau^2} \right)}$$

soit :

$$\boxed{\tau' = \tau \sqrt{1 + (1.47 \; \frac{LD\lambda^2}{\tau^2})^2}}$$

où $D = L^{-1} \frac{dT}{d\lambda}$ avec T : temps de transit pour une longueur L

avec LD en ps/mm

λ en µm

τ en ps

Les résultats en fonction de la durée de l'impulsion d'entrée sont présentés figure 34 pour 20 cm d'eau.

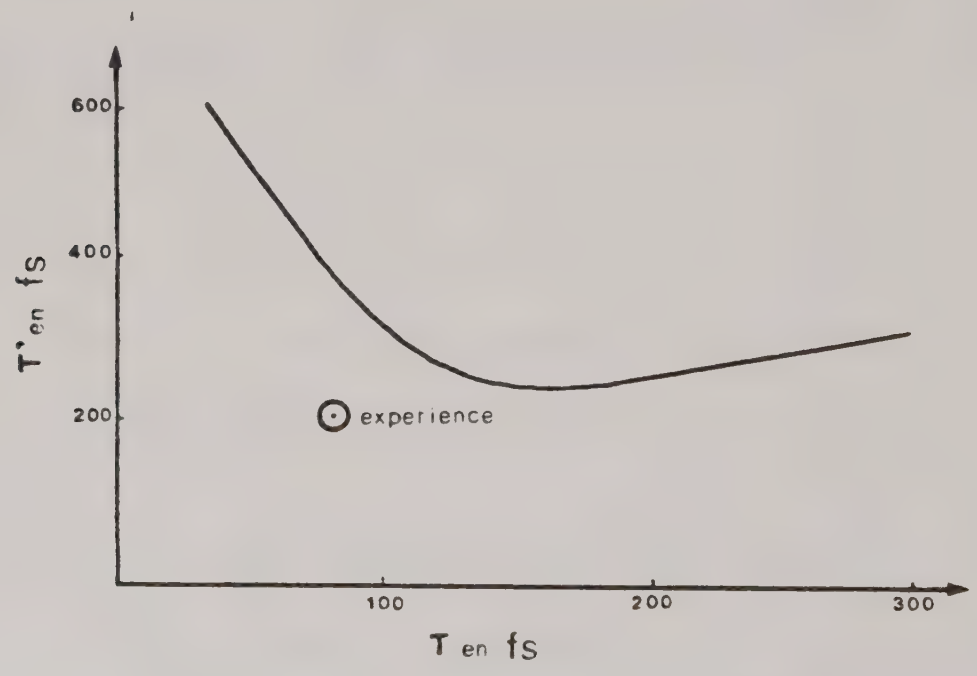


Figure 34 : Courbe théorique donnant la largeur τ' d'une impulsion gaussienne après un parcours L=20 cm d'eau (λ=0.62 µm) en fonction de la durée τ de l'impulsion initiale.

La comparaison entre l'expérience et la théorie montre que l'élargissement observé est moindre que celui calculé. La principale raison en est que nos impulsions ne sont pas gaussiennes (pour une gaussienne on a $\Delta t.\Delta\nu = 0.441$) mais du type cosecante carrée ($\Delta t.\Delta\nu = 0.31$) donc à spectre plus étroit.

3.3.2. Compensation de la dispersion linéaire : compression d'impulsion.

Comme nous venons de le voir, plusieurs facteurs produisent un élargissement des impulsions, le plus important étant la dispersion de la vitesse de groupe. Ainsi, sans l'utilisation de système correctif, l'impulsion passe de 85 Fs à la sortie de l'oscillateur à 600 Fs au niveau de l'échantillon à photodissocier, ce qui n'est pas acceptable.

L'idée est de faire passer l'impulsion dans un milieu à dispersion positive ($\frac{dn}{d\lambda} > 0$) qui doit permettre de corriger la dispersion négative de l'amplificateur.

De tels milieux non absorbants n'existent pas dans la nature. Par contre il est possible de construire un " milieu équivalent " à l'aide de deux réseaux, comme indiqué figure 35.

Un tel système possède une dispersion positive, les longueurs d'onde les plus grandes (celles qui sont en avance à la sortie des milieux dispersifs usuels) sont ici les plus déviées, donc parcourent un chemin plus grand. La distance L entre les 2 réseaux peut être ajustée de telle sorte que la dispersion de l'amplificateur soit exactement compensée, ou mieux que la dispersion totale soit exactement compensée au niveau de l'échantillon !

D'après Fig.35 $\quad AD = L \dfrac{d\beta}{\cos^2\beta}$

La loi de diffraction d'un réseau est donnée par :

$\sin\alpha - \sin\beta = k \dfrac{\lambda}{a}$ avec k : ordre de diffraction

a : pas du réseau

Pour α constant et pour une variation $d\lambda$ on a :

$$-\cos\beta \; d\beta = \frac{k}{a} \; d\lambda$$

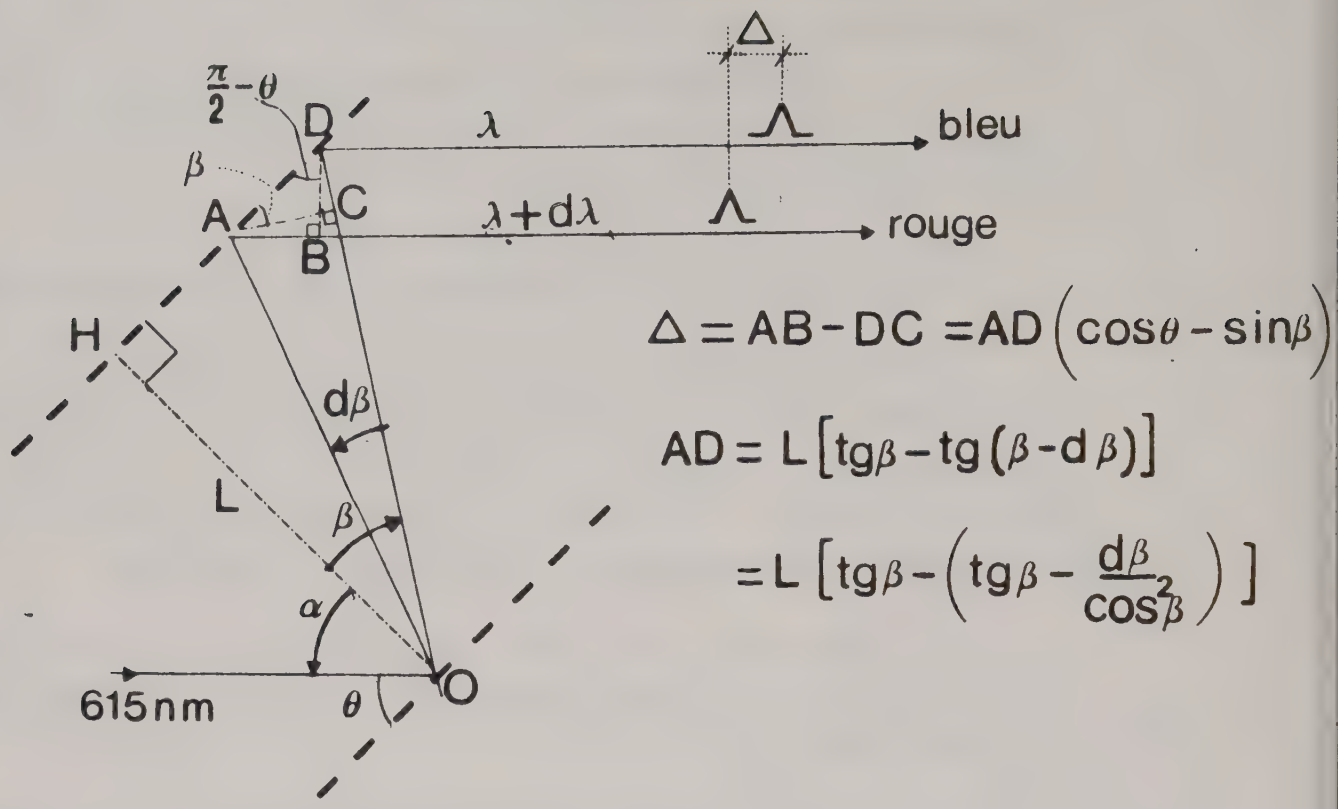


Figure 35 : Principe de la compression d'impulsions à l'aide de 2 réseaux

d'où $AD = k\,L\,\dfrac{d\lambda}{a\cos^3\beta}$

La variation du chemin optique entre deux composantes espacées de $d\lambda$ est

$$\Delta = -\,kL\,\frac{d\lambda}{a\cos^3\beta}(\cos\theta - \sin\beta) = \frac{k^2 L}{\cos^3\beta}\left(\frac{\lambda}{a}\right)\left(\frac{d\lambda}{a}\right)$$

et la dispersion est :

$$\frac{1}{c}\,\frac{d\Delta}{d\lambda} = -\,\frac{1}{c}\,\frac{k^2}{\cos^3\beta}\left(\frac{L}{a}\right)\left(\frac{\lambda}{a}\right)$$

Dans notre configuration : $a = 1/600$ mm $= 1.66$ µm

$\alpha = 45°$ $\quad \lambda = 0.62$µm

$L = 10$ cm

On obtient $\boxed{\dfrac{1}{c}\,\dfrac{d\Delta}{d\lambda} = 60 \text{ Fs/mm}}$

ce qui correspond à la dispersion que l'on peut calculer avec un parcours de 25 cm d'eau (milieux amplificateurs) plus 5 cm de quartz (optiques).

Un tel compresseur à la sortie de l'amplificateur permet de recouvrer des impulsions de 100 Fs. C'est ce schéma qu'ont adopté Shank et coll. (1982).

Il faut noter que le rendement d'un réseau est inférieur à 0.7 (usuellement 0.3 à 0.4). Le passage dans le compresseur fait donc perdre un facteur 2 à 3 dans l'énergie de l'impulsion amplifiée. Pour éviter de telles pertes, nous avons introduit cette compression entre les 2ème et 3ème étages d'amplification,de telle sorte que la saturation du gain dans les 2 derniers étages permette de compenser ces pertes, ceci cependant aux dépens d'un très léger élargissement de l'impulsion.

3.4. CARACTERISTIQUES DE LA CHAINE LASER-AMPLIFICATEUR

Celles-ci sont résumées dans le tableau suivant :

CONFIGURATION	DURÉE ps	ENERGIE PUISSANCE CRÊTE	TAUX DE RÉPÉTITION	DOMAINE SPECTRAL nm
OSCILLATEUR À BLOCAGE DE MODES ACTIF	0,5	1 nJ 2 kW	82 MHz	570 ↘ 620
OSCILLATEUR LINÉAIRE, À BLOCAGE DE MODES PASSIF	0,4	1 nJ 2,5 kW	0 → 1 MHz	605 ↘
IDEM + 3 ÉTAGES D'AMPLI POMPÉS PAR YAG	0,4	1 mJ 2,5 GW	10 Hz	↘ 620
OSCILLATEUR EN ANNEAU, À BLOCAGE DE MODES PASSIF	0,07	0,1 nJ 1,5 kW	70 MHz	615 ↘
IDEM + 4 ÉTAGES D'AMPLI POMPÉS PAR YAG	0,1	1 mJ 10 GW	10 Hz	↘ 620

Tableau 8 : Caractéristiques de la chaîne laser-amplificateur

Nous donnons, à titre d'exemple, la figure d'autocorrélation obtenue avec un amplificateur légèrement saturé, ce qui a pour conséquence un élargissement sensible de l'impulsion (160 Fs) (figure 36).

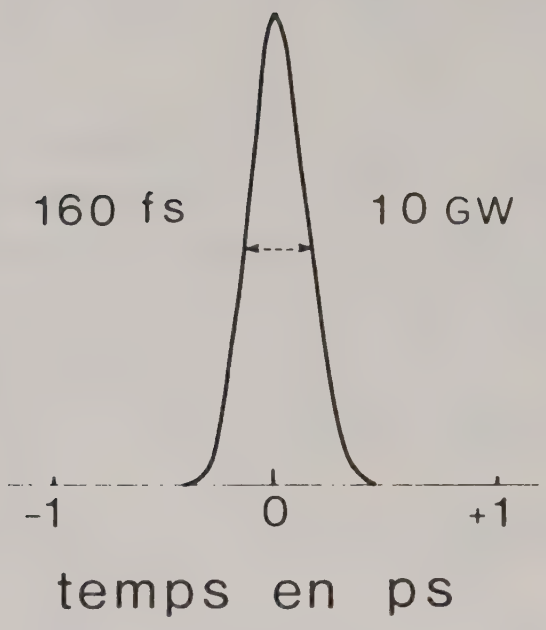


Figure 36 : Autocorrélation de l'impulsion amplifiée en régime légèrement saturé, après compensation de la dispersion.

3.5. SPECTROSCOPIE FEMTOSECONDE

3.5.1. Génération du continuum - Etude théorique

A ce jour, trois hypothèses principales ont été avancées pour expliquer la génération de cet élargissement spectral :

- automodulation de phase
- interaction paramétrique à quatre photons
- ionisation par avalanche.

Automodulation de phase

Une impulsion lumineuse intense se propageant dans un milieu non absorbant peut modifier ses propres caractéristiques en modulant l'indice de réfraction de ce milieu. Supposons une onde plane avec une polarisation linéaire. Dans l'approximation classique où l'enveloppe de l'intensité varie lentement par rapport à la fréquence ω, l'équation de propagation de l'onde suivant l'axe z s'écrit :

$$\frac{n}{c}\frac{\partial E}{\partial t} + \frac{\partial E}{\partial z} = -\frac{i\omega}{2nc\varepsilon_o} P_{NL}$$

où n est l'indice de réfraction du milieu, E le champ électrique, ε_o la permittivité du vide, P_{NL} la polarisation non linéaire : $P_{NL} = \varepsilon_o\{\chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \ldots\}$ avec $\chi^{(i)}$ la susceptibilité diélectrique d'ordre i.

Cette relation peut s'écrire en fonction de la variation d'indice δn, variation induite par l'impulsion :

$$\frac{n}{c}\frac{\partial E}{\partial t} + \frac{\partial E}{\partial z} = -i\,\frac{2\pi\,\delta n}{\lambda n} E$$

avec λ la longueur d'onde dans le vide.

On pose :

$$E(z,t) = E_o(z,t)\, e^{-i k s(z,t)}$$

tel que s (z,t) (souvent dénommé "l'eikonal") contienne toutes les informations sur la phase et que E_o (z,t) soit réel. On se place dans le repère local : $z' = z$ et $t' = t - \frac{nz}{c}$ et on néglige les effets de dispersion chromatique. En substituant E

dans la première équation, et en séparant partie réelle et partie imaginaire, on trouve :

$$\frac{\partial}{\partial z'} E_o (t') = 0$$

$$\frac{\partial}{\partial z'} s (t') = \frac{\delta n}{n} (t')$$

La première équation indique que la forme de l'onde n'est pas modifiée. Seul s (z,t) est modulé par δn qui a pour valeur :

$$\delta n = n_2 \frac{E_o^2}{2}$$

où n_2 est, par définition, l'indice non linéaire du milieu. En intégrant sur la longueur ℓ du milieu, on trouve :

$$s (t') = n_2 \frac{E_o^2 (t')}{2n} . \ell$$

La phase de l'onde, prise égale à zéro lorsque l'impulsion pénètre dans le milieu, est donc à la sortie :

$$\phi (t') = \frac{2\pi n}{\lambda} s (t') = \frac{\pi n_2}{\lambda} E_o^2 (t') \ell$$

et le champ à la sortie :

$$E (\ell, t') = E_o (t) e^{-i \frac{\pi n_2 \ell E_o^2 (t')}{\lambda}}$$

En général, pour atteindre le spectre, on doit calculer la transformée de Fourier de E (ℓ,t). Néanmoins, quelques indications simples peuvent nous aider à comprendre le phénomène.

Sur la figure 37, on a en fonction du temps :

a) l'intensité I (t) de l'impulsion, représentant sa forme temporelle
b) la variation de phase ϕ (t) due à la variation non-linéaire instantanée de l'indice de réfraction du milieu
c) la dérive instantanée de fréquence : $\Delta\omega (t) = \frac{-\partial \phi}{\partial t}$

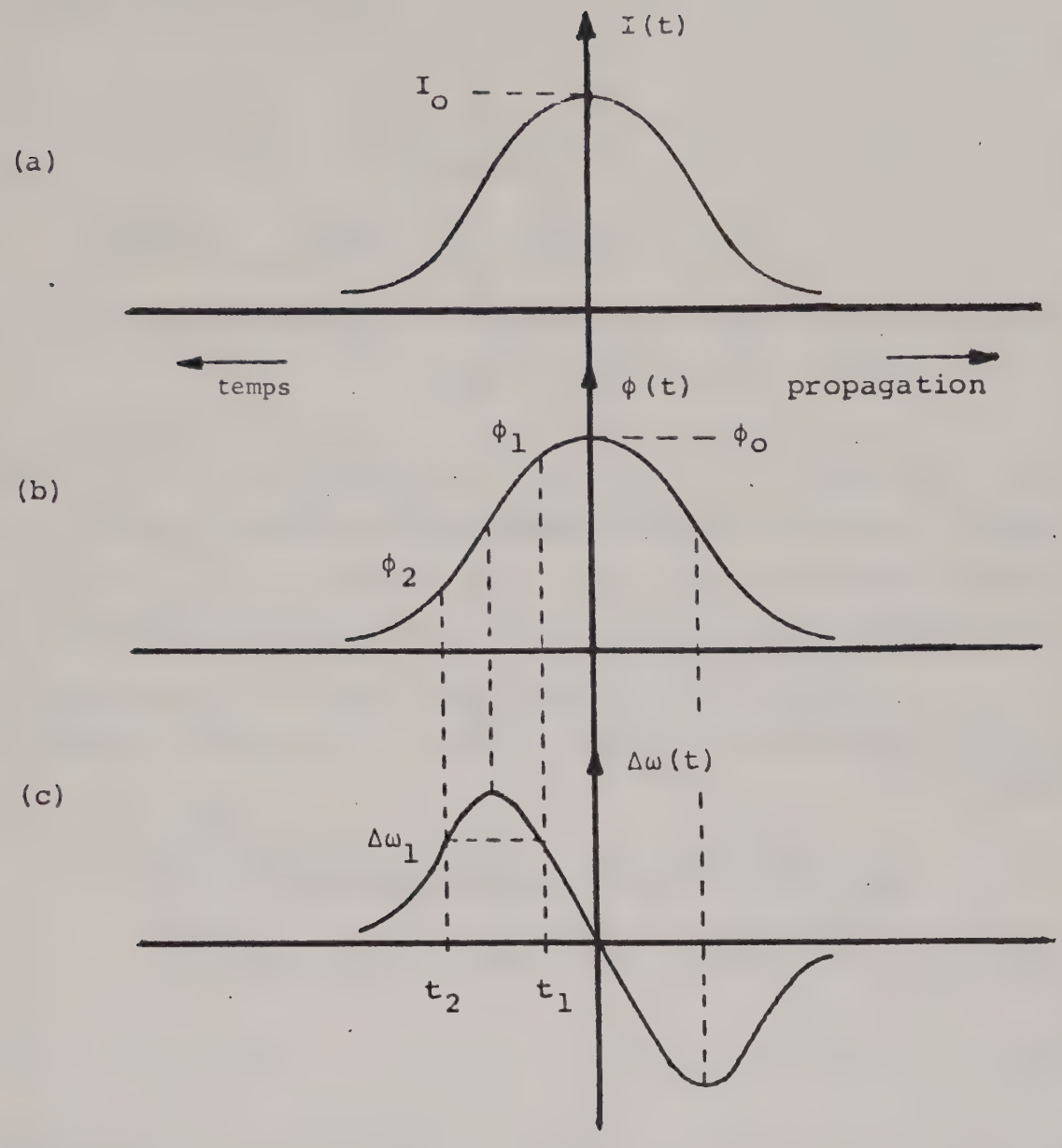


Fig. 37 : Intensité I(t), variation de phase $\phi(t)$ et dérive instantanée de fréquence $\Delta\omega(t)$ en automodulation de phase.
(figure reprise du cours "Nonlinear Optics" de E.P. Ippen, Bell Telephone Lab.(1978)

De cette dérive de fréquence, il résulte un élargissement spectral instantané $\underline{\Delta}\omega\ (t)$:

$$\underline{\Delta}\omega\ (t) = \Delta\omega_{AS}\ (t) - \Delta\omega_{S}\ (t) = \left(\frac{\partial\phi}{\partial t}\right)^{AV}_{Max} - \left(\frac{\partial\phi}{\partial t}\right)^{AR}_{Max}$$

$$= \left|\Delta\omega_{AS}\ (t)\right| + \left|\Delta\omega_{S}\ (t)\right| = \left|\left(\frac{\partial\phi}{\partial t}\right)^{AV}_{Max}\right| + \left|\left(\frac{\partial\phi}{\partial t}\right)^{AR}_{Max}\right|$$

où S se réfère à la région Stokes et AS à la région anti-Stokes, AV au front avant de l'impulsion et AR au front arrière.

Des interférences spectrales se produisent lorsque la variation de phase a pour valeur : $\phi\ (t) > \pi$. Lorsque deux instants t_1 et t_2 de l'impulsion contribuent au même $\Delta\omega\ (t)$ (v. fig.37), ils contribueront constructivement ou destructivement suivant leur phase relative. Par exemple, si $\phi_1 = \phi_2 + m\pi$, il y aura près de $\delta\omega_1$ un minimum spectral si m est impair ou un maximum spectral si m est pair.

Le centre du spectre ($\Delta\omega = 0$) se trouvera sur un minimum (par interférence des composantes symétriques des flancs de l'impulsion supposée symétrique) lorsque :

$$\phi_0 = (2m + 1) \qquad \text{avec } m = 0, 1, 2, 3, \ldots$$

c'est-à-dire : $\dfrac{2\pi n_2 \ell\ I_0}{\lambda n\ \varepsilon_0\ c} \simeq (2m + 1)\ \pi$

d'où $$I_0 = \frac{\lambda n \varepsilon_0\ c(2m + 1)}{2n_2\ \ell}$$

Afin d'illustrer la modulation des spectres, sur la figure 38 sont représentés 3 cas différents : $\ell_3 >> \ell_2 > \ell_1$ (ou, ce qui est équivalent, trois intensités crête différentes de l'impulsion incidente : $I_3 >> I_2 > I_1$).

Le nombre N de minima de part et d'autre de la fréquence centrale (celle de l'impulsion) satisfait à la relation :

$$(2N + 1)\ \pi \geq \phi_0 \geq (2N - 1)\ \pi$$

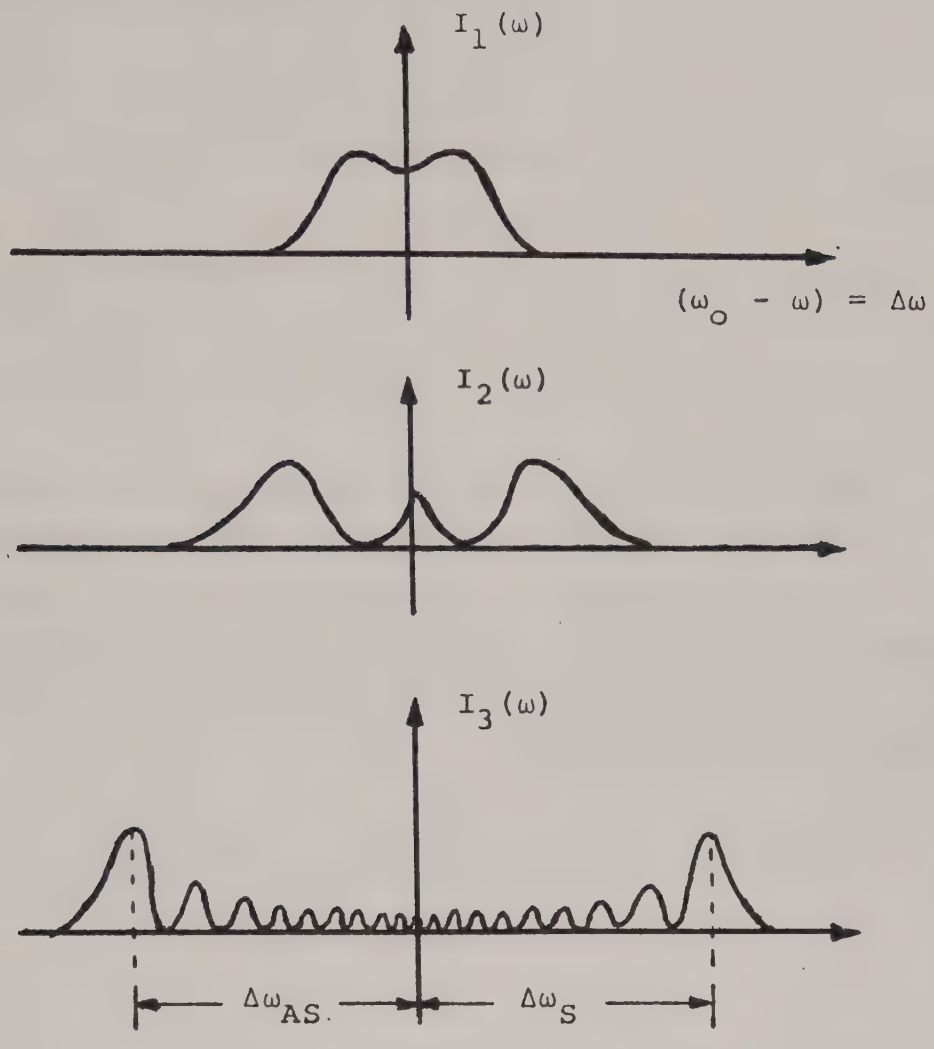


Fig.38 : Modulation des spectres en automodulation de phase pour trois intensités crête différentes de l'impulsion incidente : $I_3 >> I_2 > I_1$
(figure reprise du cours "Nonlinear Optics" de E.P. Ippen, Bell Telephone Lab. (1978).

On peut alors, connaissant n_2 et ε_0, déterminer l'intensité crête.

Pour une impulsion gaussienne de durée t_p et d'intensité :

$I(t) = I_0 \exp\left[(-\text{Log}_e 2 \frac{t^2}{t_p^2}\right]$ avec $I_0 = \frac{n \varepsilon_0 c}{2} E_0^2$, l'élargissement spectral maximum sera égal à :

$$\Delta\omega_{Max} = |\Delta\omega_S| + |\Delta\omega_{AS}| \simeq 2 \left|\frac{\partial\phi}{\partial t}\right|_{Max} = \left|\frac{4\pi n_2 \ell}{\lambda n \varepsilon_0 c} \cdot \frac{\partial I(t')}{\partial t}\right|_{Max}$$

$$\simeq \frac{I_0}{t_p} \cdot \frac{4\pi n_2 \ell}{\lambda n \varepsilon_0 c} \cdot \sqrt{\frac{\text{Log}_e 2}{2}}$$

Ainsi, dans le cas d'une impulsion gaussienne, la mesure de $\Delta\omega_{Max}$ et celle de N permettent de déterminer l'intensité crête et la durée de l'impulsion.

Le calcul précédent néglige les effets du temps de relaxation du milieu et de la dispersion chromatique. Cependant, s'il explique l'élargissement spectral de part et d'autre de la fréquence de l'impulsion, il ne peut à lui seul expliquer la génération du continuum observé.

Nous allons décrire un processus vraisemblablement dominant aux fortes intensités d'impulsion : l'interaction paramétrique à quatre photons.

Interaction paramétrique à quatre photons

Ce phénomène est lié à la susceptibilité diélectrique non linéaire du troisième ordre $\chi^{(3)}$ et, plus particulièrement, à ses termes résonnants. L'interaction à quatre photons la plus générale est de la forme :

$$\omega_1 + \omega_2 \rightarrow \omega_3 + \omega_4$$

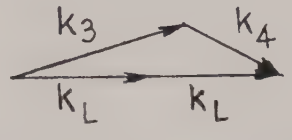
et provient du terme $\chi^{(3)}(\omega_1, \omega_2, -\omega_3, -\omega_4)$.

Si $\omega_1 = \omega_L$ est la fréquence laser, nous obtenons le phénomène primaire :

$$\omega_L + \omega_L = \omega_3 + \omega_4$$

Ce phénomène fait intervenir les accords de phase et donc des angles privilégiés vérifiant (v. ci-contre) :

$$2\vec{k}_L - \vec{k}_3 - \vec{k}_4 = \Delta\vec{k} = 0$$



Ceci explique parfaitement la structure en couronnes des fréquences Stokes et anti-Stokes. Cependant, on observe qu'une grande partie du continuum est émise dans un angle très petit. Ceci est peut-être dû au fait qu'un $\chi^{(3)}$ très important tolère un désaccord de phase $\Delta\vec{k}$ important. Le phénomène primaire explique le continuum structuré quand le laser est près du seuil du phénomène. Au-dessus du seuil, la structure spectrale est plus régulière, ce qui peut s'interpréter par un phénomène secondaire :

$$\omega_L + \omega_2 \rightarrow \omega_3 + \omega_4$$

où ω_2 est un photon émis à partir du processus primaire. Cette théorie a été développée par PENZKOFER et coll(1973)Ceci explique aussi que l'on puisse, par ce processus secondaire, obtenir des fréquences supérieures à $2\omega_L$, fréquences qui ne peuvent être engendrées par le processus primaire $\omega_L + \omega_L$.

Ionisation par avalanche

BLOEMBERGEN (1973)a émis l'hypothèse que l'ionisation par effet d'avalanche pouvait produire une contribution négative sur l'indice, ce qui aurait pour résultat de faire décroître δn sur le front arrière de l'impulsion. La densité de plasma s'accroissant très rapidement, il se produirait un rapide changement de phase, donc une variation importante de fréquence. Cependant, ce processus peut se comparer à celui d'automodulation de phase et, par conséquent, est insuffisant pour expliquer à lui seul le phénomène du continuum.

Domaine spectral utilisable

Nous avons mesuré l'intensité du continuum en fonction de la longueur d'onde. Nous présentons figures 39 et 40, les parties extrêmes qui donnent en fait la sensibilité de l'appareillage de détection.

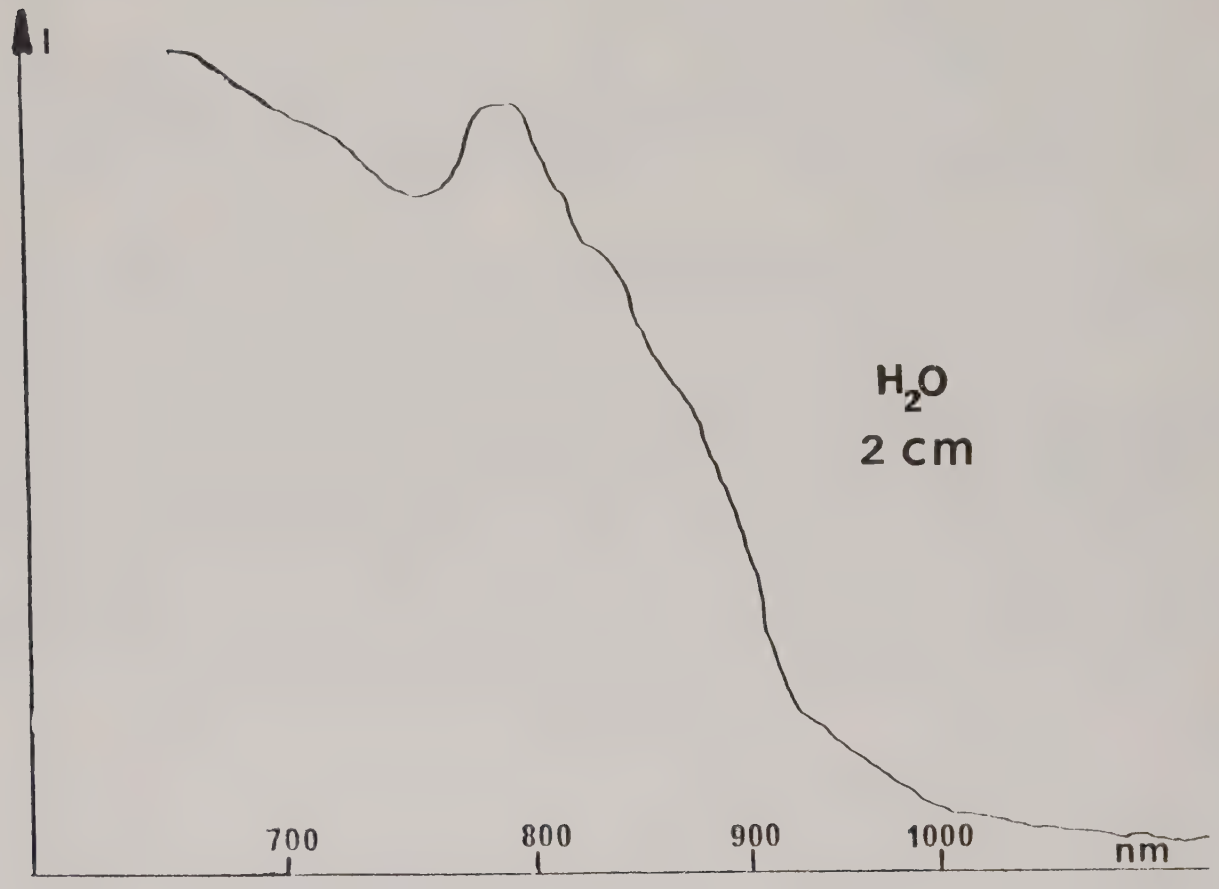


Figure 39 : Continuum dans sa partie infrarouge (limite de sensibilité du détecteur : plaque photographique I N)

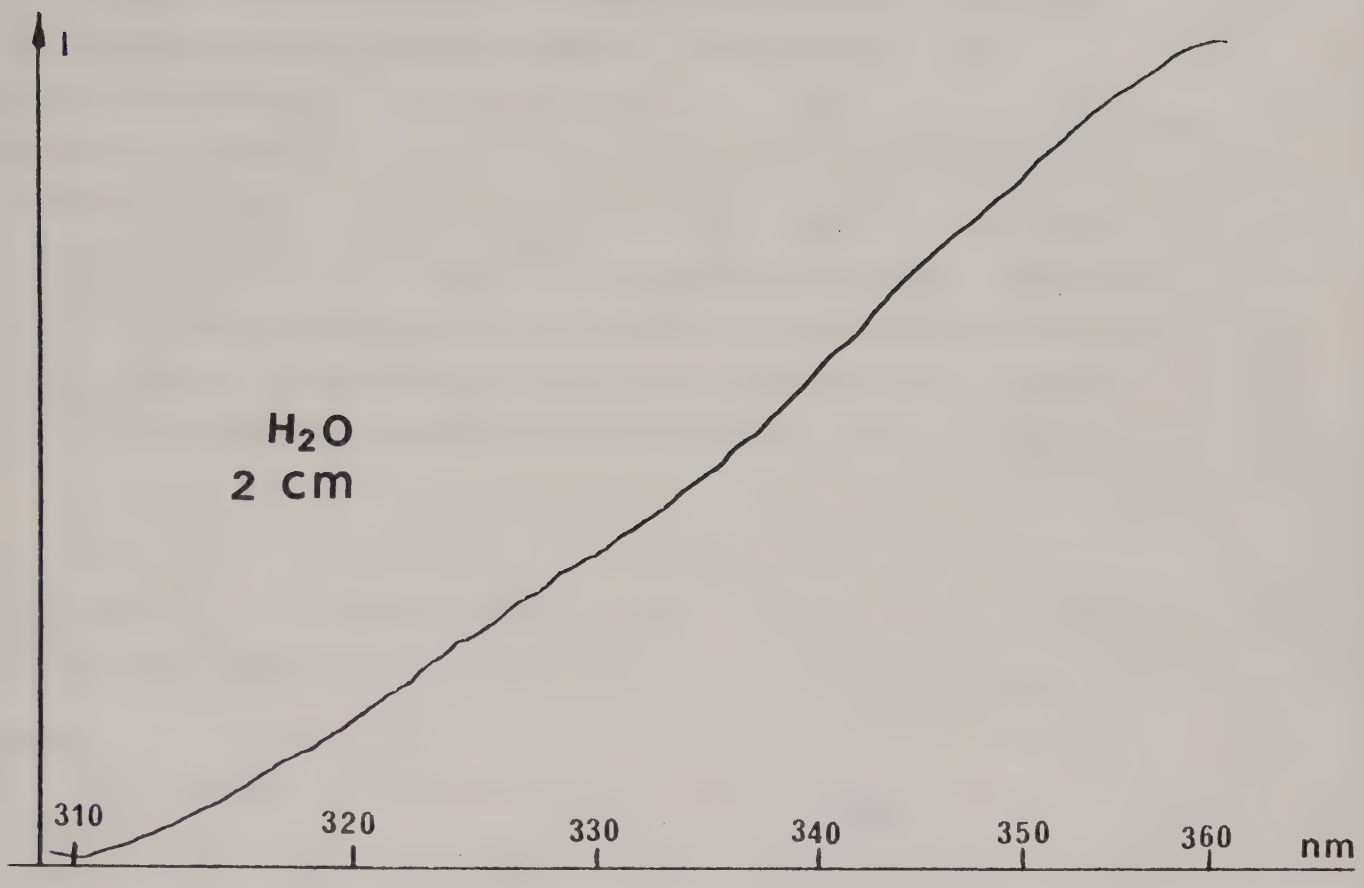


Figure 40 : Partie UV du continuum (2cm H_2O). Déclin en partie provoqué par la fonction de détection.

3.5.2. La technique excitation-test avec ligne à retard optique

Les expériences de spectroscopie résolue dans le temps ont été réalisées suivant le schéma classique de faisceaux excitateurs et tests. Dans les expériences de photodissociation, nous avons utilisé comme faisceau excitateur, soit le 2ème harmonique de l'impulsion fondamentale (10 µJ à 309 nm et durée inférieure à 100 Fs), soit nous utilisons un deuxième faisceau continuum où nous sélectionnons un $\Delta\lambda$ qui est ensuite amplifié (voir § 3.6).

Pour la partie mesure, nous utilisons un double faisceau de continuum, le faisceau direct (le test) passant dans la partie excitée de l'échantillon, tandis que le faisceau indirect (la référence) passe hors de l'échantillon. Ces deux faisceaux sont alors focalisés sur la fente d'un spectromètre de 0,25 m de focale et au 1er ordre d'un réseau à 600 traits/mm.

On peut utiliser alors un analyseur optical multicanal qui enregistre les deux spectres pour un retard optique (donc temporel : 300 µm = 1 ps) donné entre l'impulsion excitatrice et l'impulsion test, effectue le rapport du faisceau référence par le faisceau test et prend le logarithme décimal. On obtient directement de la sorte le spectre d'absorption de l'échantillon pour un retard donné (précision ∿ 6 fs) et ses variations. Les cinétiques fines à une longueur d'onde donnée sont mesurées de façon différente ; les énergies des impulsions test et référence sont observées par deux diodes. Les deux signaux correspondants sont pris en compte par une chaîne d'acquisition vers un ordinateur qui prend leur rapport et les traite suivant une fonction multicanale. Chaque balayage comporte 100 points de mesure, et -typiquement 20 à 40 balayages sont suffisants pour obtenir un bon rapport signal/bruit.

Le montage expérimental est présenté figure 41. Le cristal KDP est remplacé par une deuxième cuve de H_2O suivie d'un filtre et d'un étage amplificateur, dans le cas d'une excitation à une valeur supposée être celle du premier niveau dissociatif.

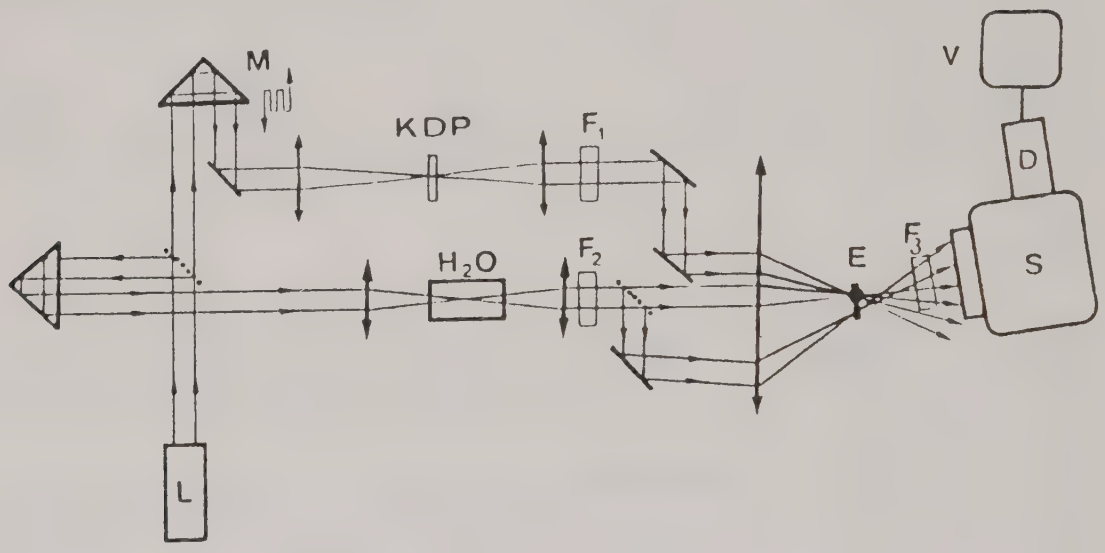


Figure 41 : Spectroscopie femtoseconde. Montage expérimental

M : moteur pas à pas (par déplacement du prisme)

L : chaîne laser + amplificateur

F_1 F_2 F_3 : filtres

E : échantillon

S : spectromètre

D : détecteur (analyseur optique multicanal ou photodiode)

V : visualisation . Acquisition

3.6. EXCITATION ACCORDABLE SUR TOUT LE SPECTRE VISIBLE

La technique du continuum a été jusqu'ici utilisée comme source spectroscopique dans le rôle du faisceau test.

Nous avons mis au point une technique originale qui permet de produire des impulsions femtosecondes ayant une puissance de plusieurs GW, accordable dans tout le spectre visible. Pour ce faire, nous remplaçons le cristal doubleur de KDP par une deuxième cuve d'eau. Nous générons ainsi un deuxième continuum (le premier étant le continuum test) dans lequel un filtre interférentiel découpe une bande spectrale. Nous avons,dans les expériences de photodissociation, centré cette bande à 580 nm (seuil supposé de la dissociation d'après Loew et coll., 1982). Cette bande spectrale de 7 nm centrée à 580 nm possède une énergie de quelques microjoules.

L'étage amplificateur utilise une solution de rhodamine 6 G dans l'eau, qui est pompée par le restant d'infrarouge du Yag doublé en fréquence par un deuxième cristal de KDP. L'énergie de pompe est ainsi de 200 mJ à 530 nm. L'impulsion continuum et l'impulsion nanoseconde du Yag, après ajustement des chemins optiques, sont donc synchrones dans la mesure où la chaîne d'amplification a déjà été synchronisée. La cellule d'amplification a une longueur de 3 cm, la section transversale du faisceau amplifié est de 0.15 cm^2.

La figure 42 représente l'ensemble du montage expérimental avec amplification du continuum.

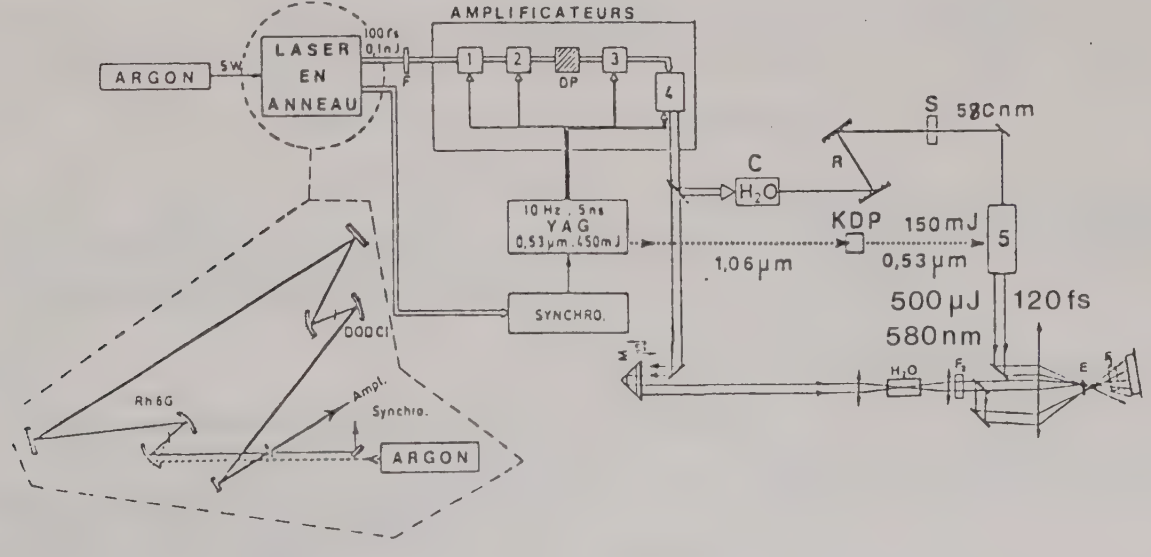


Figure 42 : Ensemble du système de spectroscopie femtoseconde avec amplification du continuum.

Une expérience de saturation du gain a été réalisée en mesurant l'énergie de sortie E (en microjoules) de l'impulsion amplifiée en fonction de l'énergie de l'impulsion d'entrée E_o (en microjoules), à l'aide d'atténuateurs calibrés. Les points expérimentaux sont en très bon accord avec la courbe théorique de saturation obtenue d'après les calculs effectués par Migus et coll.,(1980) : $E \sim 200\ \ln[1+3,3E_o]$ où E et E_o sont exprimés en microjoules, l'énergie d'excitation étant constante.

La courbe théorique, ainsi que les points expérimentaux sont présentés figure 43.

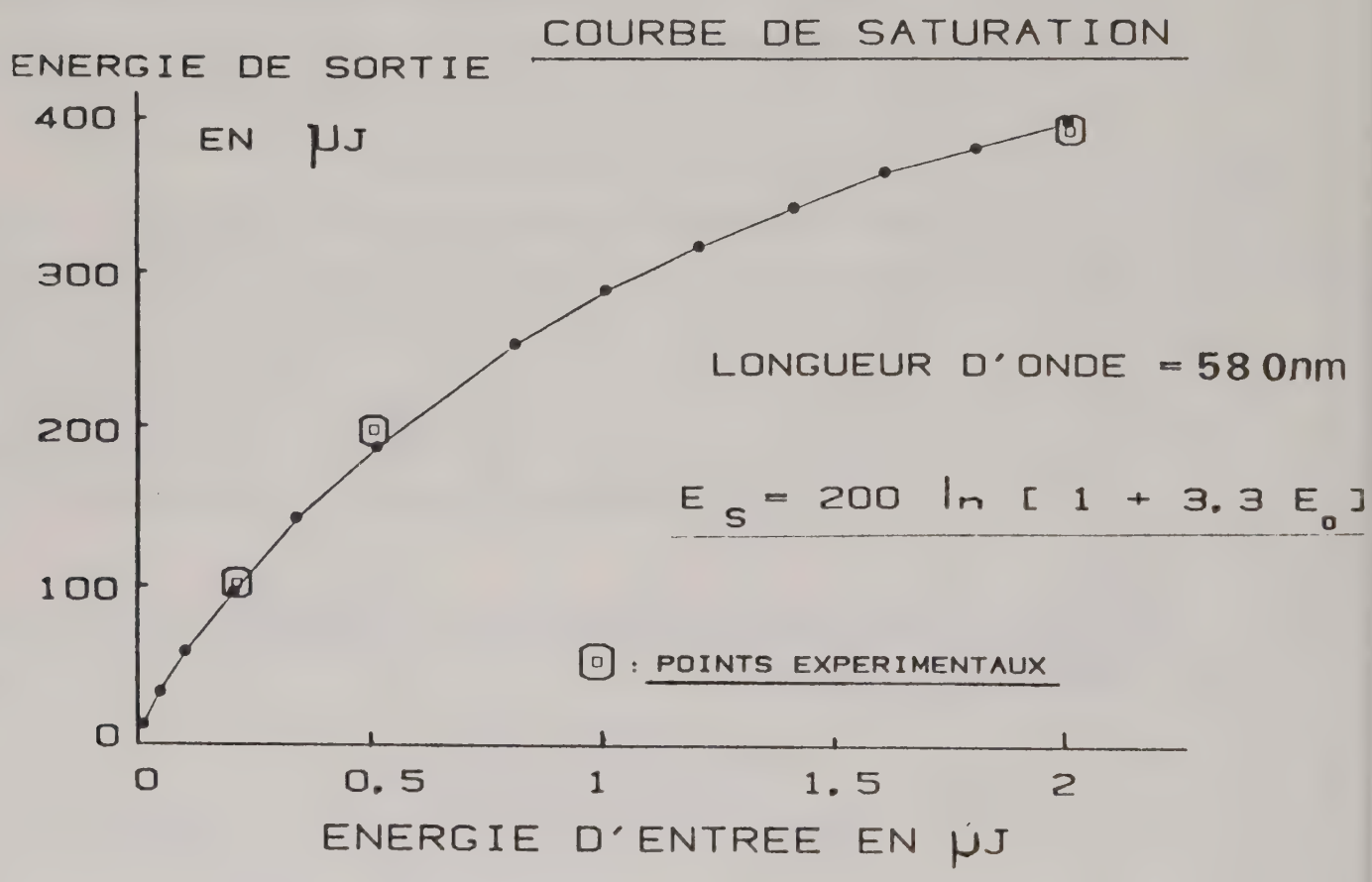


Figure 43 : Amplification du continuum à 580 nm. Etude de la saturation.

3.7. SYSTEME DE DETECTION

3.7.1. Introduction

La caractérisation précise des espèces transitoires après photodissociation, nécessite d'une part l'enregistrement à un instant donné du spectre ΔA induit, et d'autre part, pour une longueur d'onde donnée

(maximum d'absorption de l'espèce déligandée ou de l'espèce ligandée, par exemple) de mesurer la cinétique femtoseconde de cette espèce. Ceci nécessite deux systèmes de détection différents.

3.7.2. Mesure de spectres ΔA : l'analyseur optique multicanal

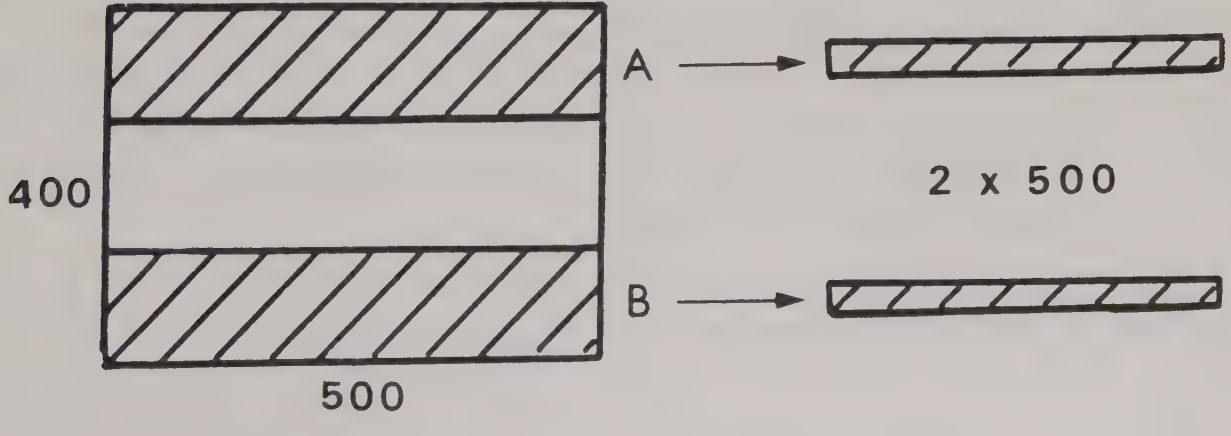
L'ensemble des résultats présentés concerne l'évolution du spectre dans la bande de Soret. Nous utilisons la technique du double faisceau continuum comme précédemment. La partie bleue de ce continuum sélectionnée à l'aide de filtres est divisée en deux faisceaux : un faisceau (mesure) teste, colinéairement au faisceau excitation, la zone excitée de l'échantillon; l'autre faisceau continuum (référence) passe à l'extérieur de l'échantillon. Ces deux faisceaux continuum sont focalisés sur la fente d'entrée (200 µm) d'un spectromètre (0,25m) utilisant au premier ordre un réseau de 600 traits/mm.

Les spectres (référence et test) sont enregistrés en remplaçant la fente de sortie du spectromètre par un analyseur optique à deux dimensions (OSA, B.M., Spektronik).

Le traitement digital est le suivant :

L'accumulation des signaux est réalisée avec 500 tirs laser sur deux accumulateurs (2 x 500). Les 500 canaux correspondent aux 500 photodiodes, donc à l'échantillonnage en longueurs d'onde.

Le tiers supérieur de la matrice de photodiode est accumulé dans l'accumulateur A, le tiers inférieur dans le B, la zone centrale sert d'isolation



Le courant d'obscurité est ensuite soustrait : A - bruit B- bruit

L'accumulateur A est ensuite divisé, canal à canal, par B (référence/test) et on prend le log

$$A = \log \left(\frac{ref}{test} \right)$$

La modification d'absorbance est la différence entre l'absorbance à + x femtosecondes et l'absorbance avant excitation (qui doit être identique à celle sans excitation).

3.7.3. Mesure des cinétiques : photodiodes et traitement temps réel

Nous utilisons alors la fente de sortie du spectromètre (200 µm) ce qui donne un $\Delta\lambda$ d'échantillonnage de 10 Å . Les deux signaux référence et test à une fréquence donnée sont enregistrés par des photodiodes et envoyés dans une chaîne d'acquisition. Un programme d'analyse multicanale implanté sur ordinateur donne la transmission en fonction du temps en incrémentant par pas de x µm la ligne à retard optique. Environ 40 passages sont réalisés pour avoir un bon rapport signal/bruit.

Le pas d'incrémentation de la ligne à retard optique dépend du domaine temporel que l'on veut explorer. On dispose d'un nombre de pas de 100. Pour avoir les cinétiques 2 ps pleine échelle, on utilise des pas de x = 3 µm soit 20 Fs.

L'ensemble du cycle est automatisé. La transmission induite (ou l'absorption)est calculée à chaque tir laser pour s'affranchir des fluctuations tir à tir. Les tirs sont de plus discriminés en amplitude. Tous les tirs compris dans la tolérance sont enregistrés de manière à opérer des statistiques en différé. Nous avons écrit l'ensemble des programmes de traitement, de gestion de processus, de traitement graphique et d'ajustement en FORTRAN IV et en assembleur. Nous disposons par ailleurs, par le traitement temps réel rapide, d'un processeur arithmétique câblé. Nous ne décrirons pas ici ce traitement informatique qui a cependant représenté un certain volume de travail. Nous allons simplement présenter le principe du calcul des cinétiques avec la prise en compte de l'effet de dispersion dans l'impulsion continuum.

Pour chaque échantillon, nous analysons le temps de montée du signal à deux longueurs d'onde : l'une correspond au pic de l'espèce CO-ligandée, l'autre au pic des espèces déligandées.

Le changement d'absorption induit par une impulsion d'intensité $I_p(t)$ sur une impulsion test $I_t(t)$ avec un retard τ entre les deux impulsions est donné par :

$$\Delta\alpha\ (\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} A\,(\tau-\tau') \int_{-\infty}^{+\infty} I_p(t)\ I_t(t+\tau')\ d\tau\ d\tau'$$

Dans cette expression, $A\ (\tau)$ est la réponse impulsionnelle de l'absorption moléculaire. Dans le cas d'une réponse instantanée $A\ (\tau)$ est une constante et la réponse du milieu est alors déterminée par l'intégrale de la fonction de corrélation des impulsions.

D'autres expériences nous ont par ailleurs révélé que les impulsions ont une forme proche d'une mono-exponentielle :

$$I\ (t) \sim \exp\ \{-\frac{\ln.2}{\Delta t}\ t\}, \qquad t \geq 0$$

où Δt, la largeur à mi-hauteur, est de l'ordre de 120 fs.

Dans ce cas, tous les temps de montée correspondant à la disparition des espèces ligandées, sont proportionnels à l'intégrale des fonctions de corrélation des impulsions avec Δt = 120 fs. Les meilleurs ajustements ont été réalisés avec l'expression :

$$I/_{I_o}\ (\tau) = \exp\ \left[\ -\ \Delta\alpha\ (\tau)\ \ell\ \right]$$

où ℓ est la longueur du milieu et $I/_{I_o}$ la transmission mesurée par l'impulsion test pour un retard τ entre l'excitation et le test.

La cinétique d'apparition des espèces deox ne peut être ajustée avec une réponse instantanée, mais est très bien ajustée avec une fonction du type :

$$A(\tau_x) \propto 1 - \exp - \frac{t}{\tau_x}, \qquad t \geq 0$$

où τ_x est le temps de réponse des espèces moléculaires. Il est important dans cette échelle de temps, d'estimer l'influence de la dispersion des vitesses de groupe. Un facteur d'élargissement temporel est induit dans la cinétique mesurée car les impulsions UV* et bleues superposées dans l'échantillon se propagent avec des vitesses de groupe différentes. A la sortie de l'échantillon, il existe un retard entre l'impulsion bleue et l'impulsion UV :

$$\delta\tau = \frac{l}{c} \left[n_g\ (UV) - n_g\ (bleu) \right]$$

où c est la vitesse de propagation de la lumière et $n_g(\lambda)$ l'indice de groupe qui est relié à l'indice de phase n_ϕ :

$$n_g = n_\phi \left\{ 1 - \frac{\lambda}{n_\phi} \frac{dn_\phi}{d\lambda} \right\}$$

Nous avons calculé cet élargissement comme étant de l'ordre de 90 fs, mais il faut remarquer que ce ralentissement de la cinétique de réponse est à peu près le même entre 400 nm et 435 nm; et qu'il en est tenu compte dans l'ajustement de la réponse instantanée et n'a pas d'effet sur la détermination des constantes de temps d'apparition des espèces deox.

Nous devons aussi considérer la dispersion des vitesses de groupe à l'intérieur même de l'impulsion continuum. Cette dispersion entre deux longueurs d'onde λ_d et λ_c est donnée par :

$$\delta\tau_c = \sum_m \frac{l_m}{c} \left[n_{g,m}(\lambda_d) - n_{g,m}(\lambda_c) \right]$$

où m représente les différents éléments dispersifs entre la création du continuum et l'échantillon. Cette dispersion a été estimée à :

$$\delta\tau_c / \Delta\lambda = 4.0 \text{ fs/nm}$$

et s'exprime de deux façons :

* impulsion d'excitation qui peut aussi être à 580 nm. La dispersion est alors encore moins sensible.

1. Un ralentissement de la réponse instantanée de 60 fs dont il est tenu compte comme indiqué précédemment.

2. Un retard "pur" entre l'impulsion test et l'excitation quand la longueur d'onde test est déplacée du maximum du spectre de la population ligandée vers le maximum de la population déligandée. Pour un décalage de longueur d'onde de 15 nm, ceci donne un retard "pur" de 600 fsec qui correspond à ce que l'on mesure effectivement.

3.8. PERFORMANCES ET LIMITES DU SYSTEME

3.8.1. Linéarité dans l'enregistrement des spectres

La matrice de photodiodes utilisée, associée à un balayage électronique, est en fait l'équivalent d'une caméra bas niveau de lumière. Ce système est très sensible (15 photons/coup) et, s'il est associé à un système de refroidissement, possède un bruit électronique faible.

Cette technologie a par contre l'inconvénient important d'avoir une dynamique très faible 1 : 10. Il faut donc être très prudent dans la distorsion que la non linéarité résultante entraîne dans l'enregistrement des spectres.

Ce phénomène est particulièrement sensible dans l'enregistrement des spectres dans la bande de Soret. Nous utilisons en effet des concentrations de l'ordre de 200 à 500 µM en hèmes. C'est, à, dire des absorbances d'environ 2 D.O au maximum de la Soret. Ceci a deux conséquences :

- la partie du continuum correspondant au maximum de la Soret est très absorbée et on arrive aux limites de sensibilité du détecteur (attention aux fluctuations de bruit).

- on examine une bande spectrale d'environ 50 nm. Compte-tenu de la forme de la Soret, on analyse donc simultanément des zones à 2 D.O et à 0.5 D.O. On est donc en dehors du domaine de linéarité du détecteur.

Pour s'affranchir de ces problèmes, deux solutions :

- on diminue le bruit du système en refoidissant à 10° C.

- on utilise un filtre à la sortie du continuum, ayant un profil de transmission le plus proche possible du spectre d'absorption de la Soret.

On travaille alors à flux comparable sur l'ensemble du domaine spectral.

3.8.2. Cinétiques : résolution temporelle

Il n'existe pas de problème de linéarité avec le système à deux photodiodes. Les flux sont initialement adaptés pour ne pas saturer les photodiodes. Les modifications induites après dissociation n'entraînent pas de variations d'intensité supérieures à 300% (I_o x 3), on est largement dans le domaine de linéarité des photodiodes (dynamique d'environ 1 : 500).

Nous devons par contre nous intéresser à la résolution temporelle du système.

Nous avons vu § 3.7.3 , les limites dues au recouvrement temporel des impulsions dans l'échantillon. L'autre limite est donnée par le $\Delta\lambda$ d'échantillonnage (par dispersion). Ceci donne, compte-tenu de la durée de l'impulsion, une fonction d'appareil (donnée par l'enregistrement d'une transmission induite provoquée par un phénomène instantané):

$$\tau_{instantané} = 110 \text{ Fs}$$

Avant chaque expérience, nous mesurons cette fonction d'appareil qui est un paramètre de nos fonctions ajustement.

Le seuil de détection d'un phénomène physique ayant sa propre constante de temps est alors :

$$\tau \sim 100 \text{ Fs}$$

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1. Introduction

Ce chapitre présente les résultats les plus notables, ayant fait l'objet de publications (voir annexe). Il concerne les hémoprotéines ligandées avec CO, O_2 et NO.

4.2.Photodissociation des protéines hémiques ligandées avec CO

4.2.1. Introduction

Nous avons mesuré les spectres différentiels transitoires et les cinétiques d'absorption et de transmission induites dans des échantillons de carboxyhemoglobine (HbCO),carboxymyoglobine (MbCO) et de protohème-CO après excitation avec une impulsion laser de 250 femtosecondes. L'excitation est réalisée à 307 nm alors que la mesure utilise une impulsion continuum de longueur d'onde comprise entre 395 nm et 445 nm. Une attention particulière a été donnée au traitement des problèmes de dispersion affectant les vitesses de groupe dans la bande spectrale du continuum. Nous avons ainsi démontré que la dissociation du CO des trois espèces ligandées se produit pendant la durée de l'impulsion, alors que pour la première fois, à notre connaissance, la formation de l'espèce deox a été résolue. Nous avons mesuré une constante de temps de 350 ± 50 fsec pour la cinétique de formation de Hb, Mb et protohème. Ceci révèle l'absence d'influence de l'environnement protéique sur la cinétique d'apparition des espèces deox. Ces résultats suggèrent la formation quasi-instantanée d'espèces transitoires S = 2, l'atome de fer encore dans le plan de l'hème. Cet état excité relaxe alors vers un état fondamental S = 2, Fe^{II} en dehors du plan de l'hème, avec une constante de temps de 350 fsec. Le très rapide changement de spin (S = 0 vers S = 2) laisse penser que cette transition se produit par l'intermédiaire d'un (au moins) état excité qui relaxe vers S = 2, et d'autre part vers des états non réactifs avec une constante de temps de 3,2 psec comme nous le révèlent les relaxations de transmissions induites. Ces résultats expérimentaux sont, en conclusion, discutés en regard des modèles théoriques établis par les lois de la dynamique moléculaire.

4.2.2. Préparation des échantillons

L'hémoglobine humaine a été purifiée sur colonne de chromatographie DEAE Sephadex, à partir d'hématies humaines fraîches. Les solutions utilisées lors de l'expérimentation ont une concentration de 100 µM en hème par dilution dans un tampon phosphate à 0,1 M à pH7 ou pH8. La solution est initialement déoxygénée sous argon saturé en H_2O, puis équilibrée à 1 atm de CO. Les solutions de Met Mb (horse heart type III, Sigma) sont transformées en $MbFe^{++}$ par addition de sodium dithionite à excès de 5M dans des conditions strictement anaérobiques, puis équilibrées sous CO pur. Une chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions est ensuite effectuée de manière à enlever le dithionite puis la solution est diluée à 100 µM en hème dans le même tampon que HbCO. Nous avons ensuite testé la pureté de HbCO et MCO par isofocalisation qui a révélé une seule bande pour les deux protéines. Le protohème (H) est préparé à partir d'hémine (bovine type I Sigma). Initialement, on réalise une solution stock (2mM) dans NaOH 1N que l'on dilue ensuite dans le polyéthylène glycol (PEG, Merck) pour obtenir une concentration finale de 0.1 mM, avec excès de 5M de Na-dithionite. La solution deox est ensuite équilibrée avec 1 atm CO et conservée à 0°C avant utilisation. Nous avons observé que le spectre deox du protohème est très dépendant du rapport des volumes PEG/NaOH. Un $\varepsilon^{420,5}_{mM.cm^{-1}} = 138,6$, valeur la plus grande, a été obtenu pour un mélange de 94 PEG/6 NaOH. Ceci peut être attribué à un processus d'agrégation des molécules de protoporphyrine quand le pourcentage PEG/H_2O est trop faible. La rapide oxydation du Fer pendant la chromatographie ne nous permet pas d'utiliser cette technique pour enlever le dithionite. Nous avons cependant vérifié que la présence de dithionite ne modifiait pas de manière importante l'absorption à 307 nm.

Les échantillons des solutions de protohème carboxylé, MbCO ou HbCO sont ensuite transférés de façon anaérobique dans une cuve à circulation en quartz de 1 mm de trajet optique initialement remplie de CO. Les spectres d'absorption ont été mesurés sur CARY 14 en début et en fin de chaque expérience, vérifiant la non dégradation des échantillons. La cuve est déplacée à une vitesse linéaire de 12 mm sec^{-1} de manière à ce que chaque impulsion lumineuse à 10 Hz teste une nouvelle région de l'échantillon. Tout les expériences sont réalisées à la température de la pièce (22 ± 1°C).

4.2.3. Résultats

Photolyse de HbCO

La figure 44(a) montre la transmission induite à 415 nm, longueur d'onde correspondant au | - ΔA | maximum. Comme il a été mentionné précédemment, cette cinétique est limitée par la durée de l'impulsion. Par contraste, la cinétique de montée de l'absorption induite à 434 nm ($|\Delta A|max$), ne peut être ajustée avec une réponse instantanée (fig.44 b). Le meilleur ajustement de la cinétique d'apparition de l'espèce Hb deox est obtenu pour τ_{Hb}=300±40 fs. Nous avons par ailleurs vérifié que τ_{Hb} est indépendant du pH, de la force ionique et de la concentration de CO entre 0,01 et 1 atm.

Photolyse de MbCO

Les expériences similaires ont été réalisées sur des solutions de MbCO, à 422,5 nm pour la transmission induite (dépeuplement de l'espèce ligandée) et à 438 nm (montée de l'espèce déligandée Mb). Comme pour HbCO, la cinétique de disparition de MbCO est limitée par la durée de l'impulsion (fig.45a), alors que la population deox croît avec une constante de temps τ_{Mb} = 320 ± 35 fs (meilleur ajustement figure 45 b).

Photolyse des solutions de protohème - CO

Comme le montre la figure (46 a-b), les cinétiques à 410 et 425 nm, longueurs d'onde correspondant à $| - \Delta A |_{max}$ et $| + \Delta A |_{max}$, sont respectivement limitées par la durée de l'impulsion et ajustées avec τ_H = 380 ± 30 fs. D'autre part, on observe à 410 nm (fig. a) une relaxation avec une constante de temps de 3,5 ps. Cette relaxation essentiellement observée dans la zone spectrale des populations ligandées est aussi présente dans le cas de HbCO et de MbCO. Cependant, il faut noter que l'efficacité de cette relaxation varie considérablement entre le protohème et MbCO ou HbCO : 50 % de relaxation après 20 ps dans le cas du protohème au lieu de 10 et 20 % pour HbCO et MbCO. Aucune relaxation ou recombinaison n'a été observée jusqu'à 100 ps.

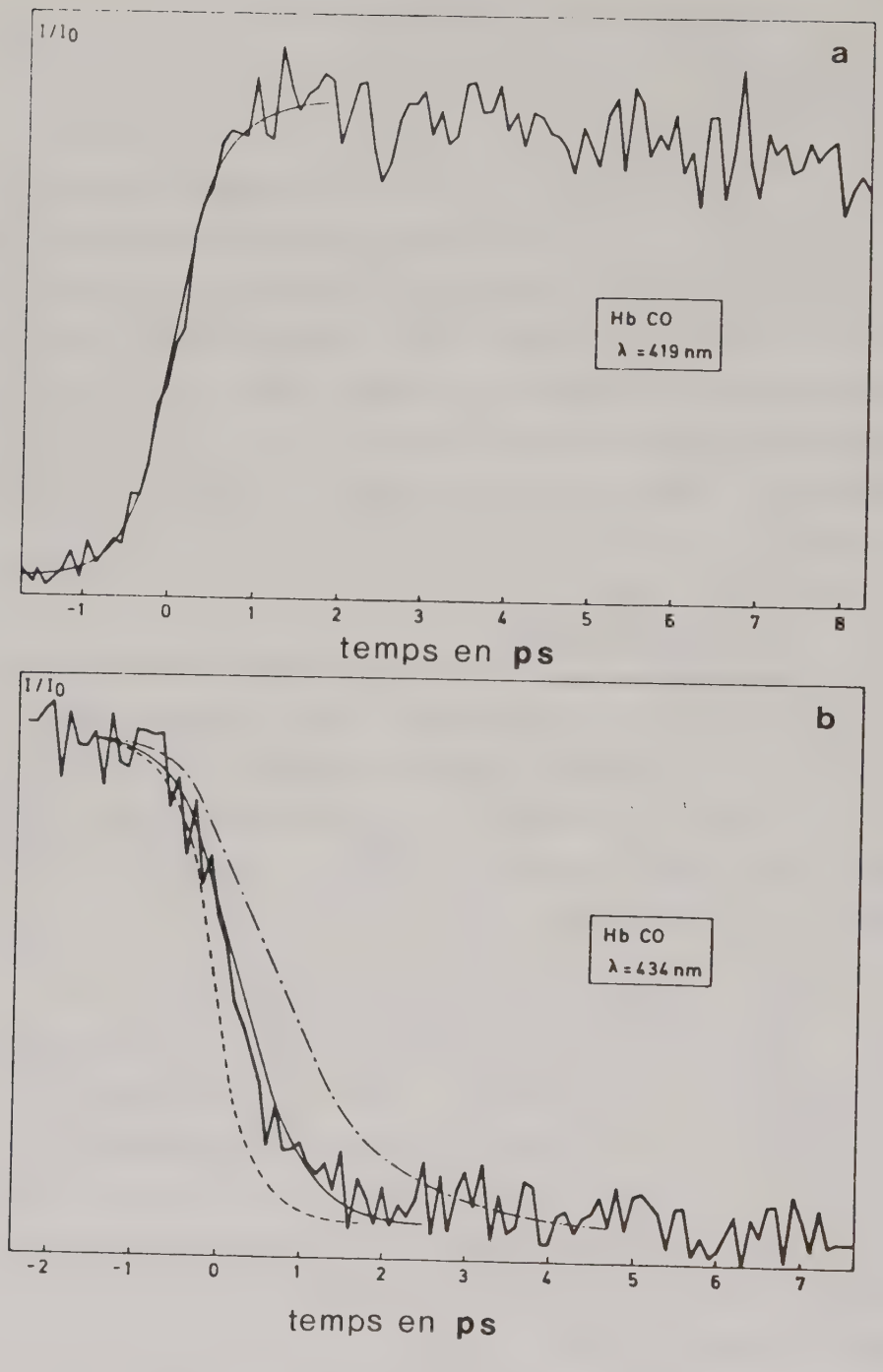


Figure 44 : Transmission induite (a) à 419 nm et absorption induite (b) à 434nm. En (a), est représenté an trait fin le meilleur ajustement correspondant à une réponse instantanée. En (b) trait fin, est superposé le meilleur ajustement (τ_{HB} = 300 fs : ——) .Les réponses avec τ_{HB} = 0 (---) et τ_{HB} = 1 ps (— · —) sont aussi simulées.

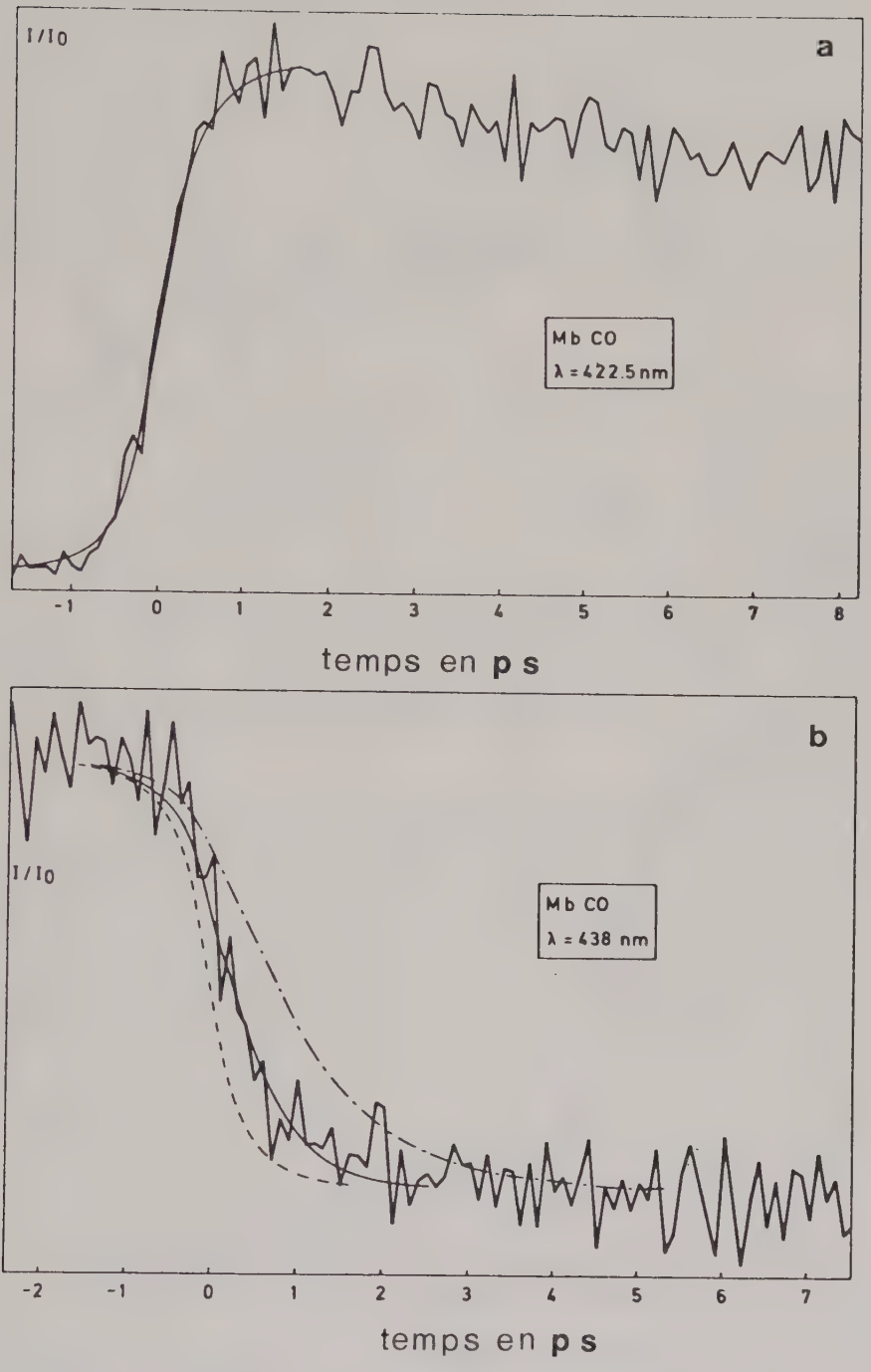


Figure 45 : Transmission induite (a) et absorption induite (b) après photoexcitation de MbCO.En (a) est représenté en trait fin le meilleur ajustement correspondant à une réponse instantanée. En (b) trait fin , est superposé le meilleur ajustement avec τ = 320 fs ainsi que la réponse instantanée (---) et à τ= 1 ps (— · —) .

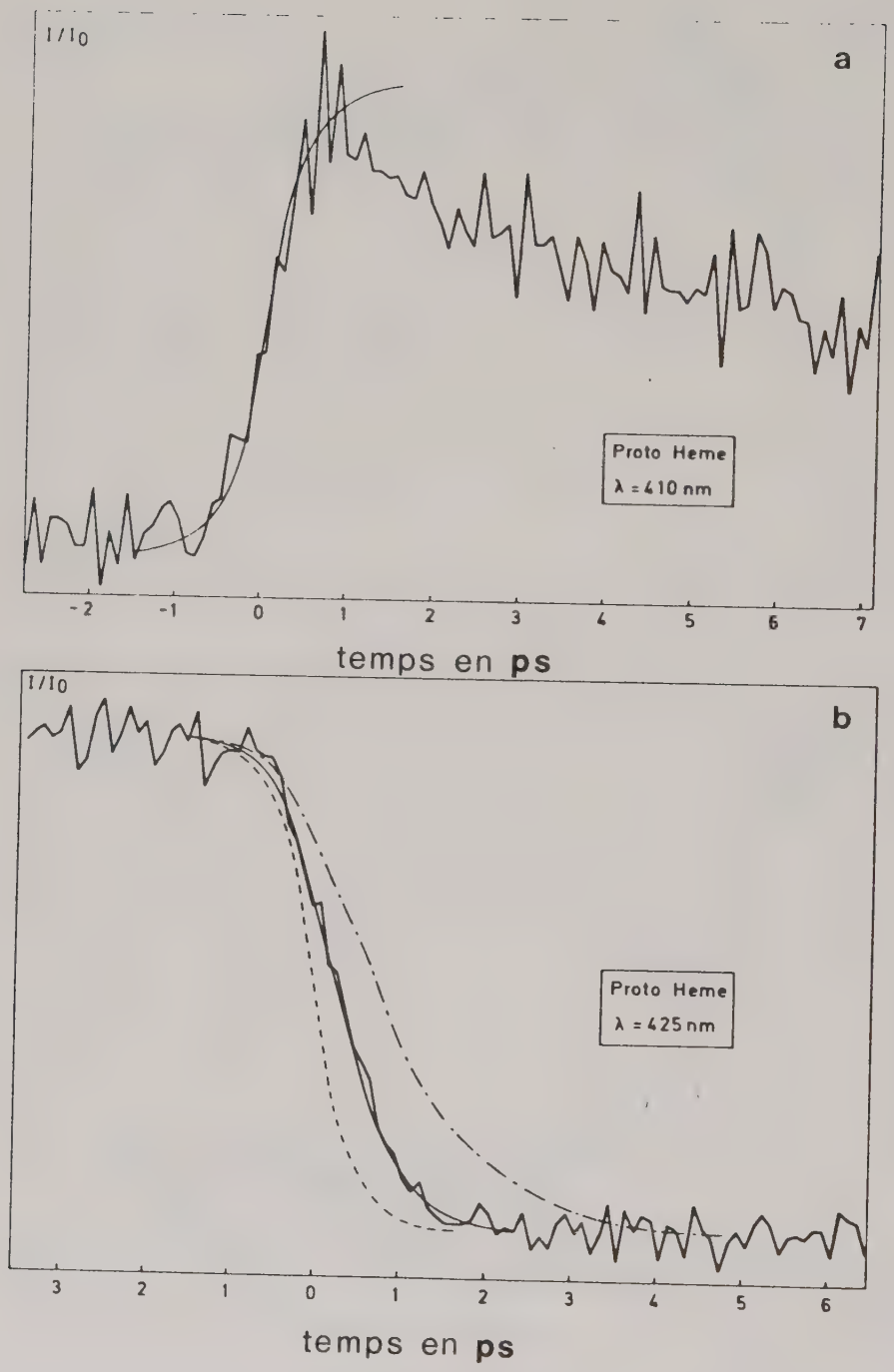


Figure 46 : Transmission induite (a) à 410 nm et absorption induite (b) à 425 nm après photoexcitation à 310 nm du protohème-CO. En (a), trait fin , est représenté le meilleur ajustement correspondant à une réponse instantanée. En (b), sont présentés le meilleur ajustement (τ_H = 380 fs : ——), les réponses si τ_H = 0 (---) et si τ_H = 1 ps (— · —)

4.2.4. Discussion et conclusions

Cinétiques

Les dynamiques de photodissociation du CO à partir de protéines hémiques est un sujet très documenté par l'utilisation de techniques laser picoseconde . La meilleure résolution temporelle associée à une analyse spectrale précise des photoproduits initiaux a été réalisée par Greene et coll(1978) Chernoff et coll(1980)et plus récemment par Cornelius et coll(1981)

Les premiers observent la formation d'une espèce Hb deox 6 ps après l'excitation à 530 nm de HbCO. En fait, la cinétique d'apparition de l'espèce Hb deox est limitée par la durée d'impulsion, comme la vitesse de disparition de l'espèce ligandée. Reynolds et coll(1981)ont, par contraste, observé la formation de deox Mb avec une constante de temps de 15 ps à la fois pour MbO_2 et MbCO, alors que l'espèce déligandée disparaît en 5 ps. Terner et coll(1981) ont montré, par Raman résonnant picoseconde, la présence de deox-Hb dans les 30 ps suivant la photodissociation de HbCO.

Nous avons démontré dans les expériences rapportées ici, que la photodissociation du CO à partir de HbCO, MbCO et de CO-protohème est réalisée en moins de 100 fs, la durée de l'impulsion excitatrice, alors que la formation de l'espèce déligandée obéit à une cinétique propre de 350 fs comme constante de temps. La formation d'espèces deox est révélée par l'apparition d'un nouveau maximum d'absorption à la même longueur d'onde que celle observée dans les spectres de différence stables. Ceci est illustré par le spectre de différence transitoire Mb-MbCO à 0 ps et 5 ps après excitation à 307 nm (Fig.47). Des spectres similaires ont été enregistrés après photolyse de HbCO et de protohème-CO.

Les cinétiques au maximum de transmission induite (Fig.44a,45a et 46a révèlent un processus de relaxation plus important, quant à son amplitude, dans le cas du protohème (50 % après 20 ps) que pour HbCO (10 %) et MbCO (10 %). Cette relaxation est essentiellement visible dans la zone d'absorption de la population ligandée. Ceci suggère la présence d'un état excité ligandé XCO* qui relaxe en partie vers l'état fondamental avec une constante de temps de 3,2 ps, valeur identique pour les trois espèces. Nos résultats peuvent être

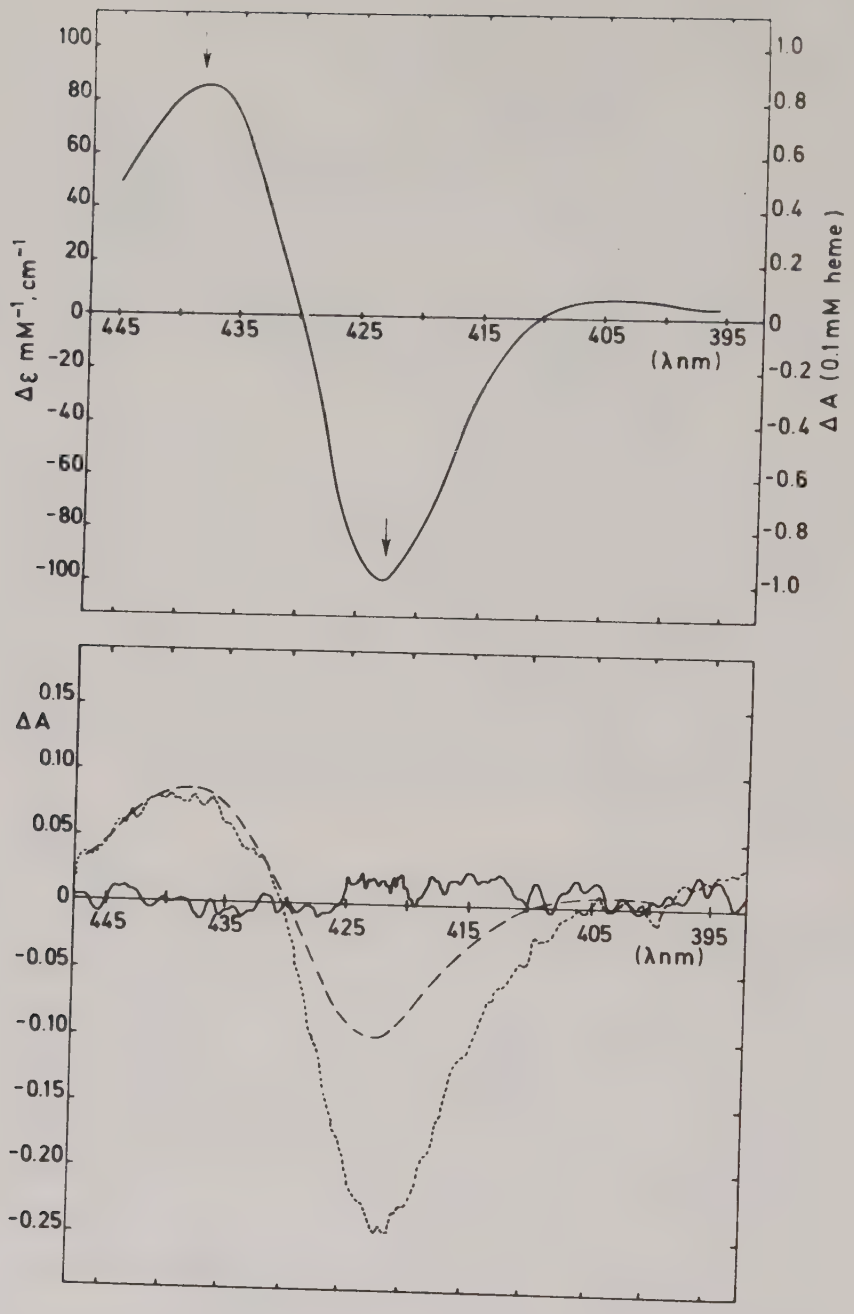


Figure 47 : Spectre de différences Mb-MbCO , 0 ps (——) et 5 ps après photoexcitation à 307 nm .Le spectre de différence stable (....) est représenté en réalisant le meilleur ajustement au maximum positif . La partie supérieure indique les longueurs d'onde auxquelles les cinétiques ont été mesurées.

comparés aux travaux récents de Cornelius et coll(1981)sur MbCO et MbO_2. Les spectres transitoires de MbCO (fig.47) sont similaires à ceux décrits par ces auteurs à 6,6 ps et 100 ps. Comme eux, nous n'observons aucune recombinaison géminée jusqu'à 100 ps. Par contre, nous démontrons que leur observation du développement simultané de l'absorption induite et de la transmission induite est la conséquence d'une vitesse d'apparition des populations déligandées de 350 fs.

Processus de photodissociation :

De telles cinétiques de formation d'espèces deox suggèrent l'existence de transitions telles que les changements de spin soient permis. Ceci nécessite la formation instantanée d'espèces ligandées transitoires S = 2 très dissociatives via un processus de transfert couplé.

Dans la terminologie de Chernoff et coll(1980) ce produit intermédiaire semble être probablement l'état $^5T_2$. Cet état semble être un bon candidat car très dissociatif vis-à-vis du CO en apportant un électron à l'orbitale dz^2 opposée à la liaison, ce qui entraîne un accroissement de la distance Fe-CO.

Les différences que l'on observe quant à l'amplitude de relaxation de l'espèce excitée peuvent être attribuées à la présence de la matrice protéique. La présence de l'ion Cl^- à la 5ème coordinence à la place de N_ε de l'histidine proximale His (F8) dans le cas du protohème, ainsi que la présence du polyéthylène glycol dans l'environnement proche de l'hème peuvent contribuer à une nouvelle configuration électronique.

Ceci peut produire une relaxation directe de l'état excité ligandé vers le niveau fondamental au lieu d'un processus plus complexe comprenant un niveau intermédiaire non réactif ayant une durée de vie supérieure à 100 ps dans le cas de HbCO et MbCO.

Dynamiques de Fe et de CO

Les travaux de Terner et coll(1981)ont montré que le mouvement de l'atome de fer Fe^{II} en dehors du plan de l'hème (au moins partiellement) se produit en moins de 30 ps. Ce résultat est en accord avec des considérations théoriques sur les mouvements de noyaux qui autorisent le déplacement d'un atome de Fer sur 1 Å dans un domaine temporel subpicoseconde. Puisque nos résultats impliquent la formation d'espèces déligandées Fe^{II} avec une constante de temps de 350 fs, il est raisonnable de postuler que le déplacement de Fe se réalise dans la même échelle de temps. Le fait que l'on n'observe aucun changement de spectre électronique entre 1 ps et 100 ps renforce cette hypothèse. La dynamique propre des molécules de CO doit aussi être analysée puisque les changements de configuration électronique du côté ligand, dans les premières centaines de femtosecondes suivant la photodissociation, doivent contribuer aux modifications spectrales observées. En effet, une molécule de CO peut être modélisée par une sphère d'interaction de 4,4 Å de diamètre . Partant d'une distance de liaison de 2 Å, l'amplitude de déplacement du CO doit être au moins de 4 Å avant que l'interaction Fe-CO devienne négligeable. Un tel déplacement nécessite quelques centaines de femtosecondes et doit rendre compte en partie des modifications de spectre pendant cette durée. En termes de barrières énergétiques, il a été estimé à partir de modèles théoriques que le temps nécessaire pour que le CO s'échappe de l'environnement proche de l'hème dans la myoglobine est de 900 fs (environ 6 pas de 0,15 ps). Il est tentant de postuler qu'aucune modification d'absorption indiquant une espèce deox stable n'apparaîtra tant que le ligand restera au contact du Fer hémique.

4.3. Photolyse et recombinaison de l'oxygène dans la myoglobine

4.3.1. Introduction

Il est bien connu(Gibson) que le rendement quantique de dissociation Φ des protéines hémiques liées à l'oxygène est bien plus petit que celui des complexes hémiques liés au monoxyde de carbone. Ainsi, dans la myoglobine, les valeurs sont respectivement Φ_{CO} proche de 1, alors que $\Phi_{O_2} = 0.03$. Si l'on peut attribuer la plus grande facilité de dissociation de la liaison Fe-CO à la différence des énergies de liaison Fe-CO et Fe-O_2, ceci ne peut pas expliquer la très grande différence des valeurs de Φ_{CO} et Φ_{O_2}. La plus grande facilité de photodissociabilité de la liaison Fe-CO peut être attribuée à l'interaction faible de la liaison d_π(Fe)-π^*(CO) comparée à la liaison dz^2(Fe)-ligand qui prédomine dans le cas de Fe-O_2. Ceci ne devrait influencer que la dépendance en longueur d'onde de Φ. De plus, on pourrait s'attendre à des valeurs similaires de Φ pour les deux ligands dans le cas où chaque photon d'excitation a une énergie plus grande ou égale à celle de la liaison Fe-(ligand). Ceci implique que toute différence observée dans les valeurs de Φ est due soit à des relaxations d'états excités, et/ou à des processus de recombinaison rapide. Un tel mécanisme a récemment été mis en évidence dans HbO_2 par Chernoff et al(1980) et dans HbCO par Friedman & Lyons(1980). Dans les solutions de MbO_2, Cornelius et al(1981) ont attribué la faible valeur de Φ_{O_2} à la relaxation de divers états excités, de durée de vie brève, produits par des processus à plusieurs photons. Dans leurs expériences où ils utilisaient des impulsions de durée 8 psec et d'énergie 10 µJ à 355 nm, ils n'ont observé aucune recombinaison subnanoseconde. Prévoyant la possibilité de processus de photodissociation très rapide à partir d'états excités, de durée de vie subpicoseconde, et/ou des processus de recombinaison dans les toutes premières picosecondes après excitation, nous avons entrepris une étude dans le domaine subpicoseconde de la photodissociation de la MbO_2.

4.3.2. Méthodes

Nous avons obtenu de la MbO_2 suivant la méthode de Rothgeb and Gurd (1978) en partant de la Mb^{3+} (Sigma type III HH) et de la (Sigma type II, SW) diluée à une concentration en hème de 0,15 mM dans un tampon pH9 (0,05 M tris) ou dans un tampon pH8 à 25° (0,1 M phosphate). On s'assure de la réduction complète des échantillons en mesurant les coefficients d'extinction dans un spectrophotomètre Cary 219 . Les expériences de spectroscopie résolue dans le temps ont été effectuées à température ambiante 22°C dans une cuve de quartz de longueur 0,1 cm. Pendant l'expérience, la cuve effectue un mouvement horizontal, de telle sorte que les impulsions qui se succèdent tous les $1/10^e$ de seconde excitent une nouvelle région de l'échantillon. Le spectre d'absorption des échantillons est mesuré après chaque expérience, de façon à s'assurer de l'absence de dégradation de la protéine.

c) Résultats

L'excitation des solutions de MbO_2 HH à 307 nm fait apparaître un grand pic négatif dans le spectre ΔA à 414 nm correspondant à un blanchiment de la bande de Soret ligandée, et induit une absorption positive à 440 nm dans la bande de Soret déligandée (fig. 48). Des résultats similaires ont été obtenus dans le MbO_2 SW, et indépendamment de la concentration d'oxygène de 150 à 750 torrs. Alors que le maximum de blanchiment à 414 nm s'est entièrement développé à + 1 psec, l'absorption induite à 440 nm apparaît avec un retard et n'est complète qu'à 3 psec. Ce délai peut, en partie, être attribué à un effet de dispersion des vitesses de groupe dans les différentes composantes optiques que traverse le continuum. De façon à mieux discriminer ces effets de dispersion des différents potentiels dans les cinétiques à 414 et 438 nm, nous avons enregistré les variations d'absorption à ces deux longueurs spécifiques (fig. 49). La partie supérieure de la figure montre que le blanchiment à 414 nm est instantané, tenant compte d'une durée d'impulsion de 0,3 psec (instantané signifie que la réponse impulsionnelle du milieu est une fonction en échelon) . A 438 nm (courbe centrale) l'ab-

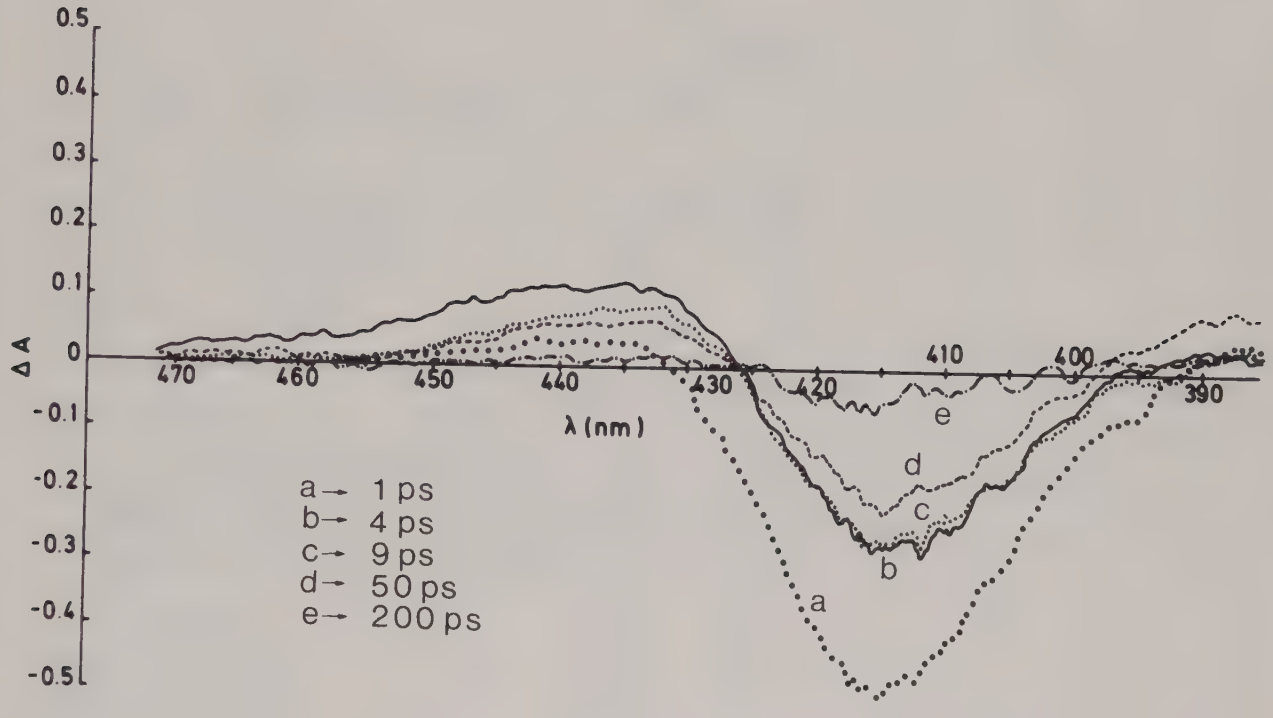


Figure 48 : Spectres de différences pour MbO_2 1 ps (....), 4 ps (——) , 9 ps (....) , 50 ps (---), et 200 ps (— · —) après photo-excitation à 307 nm .

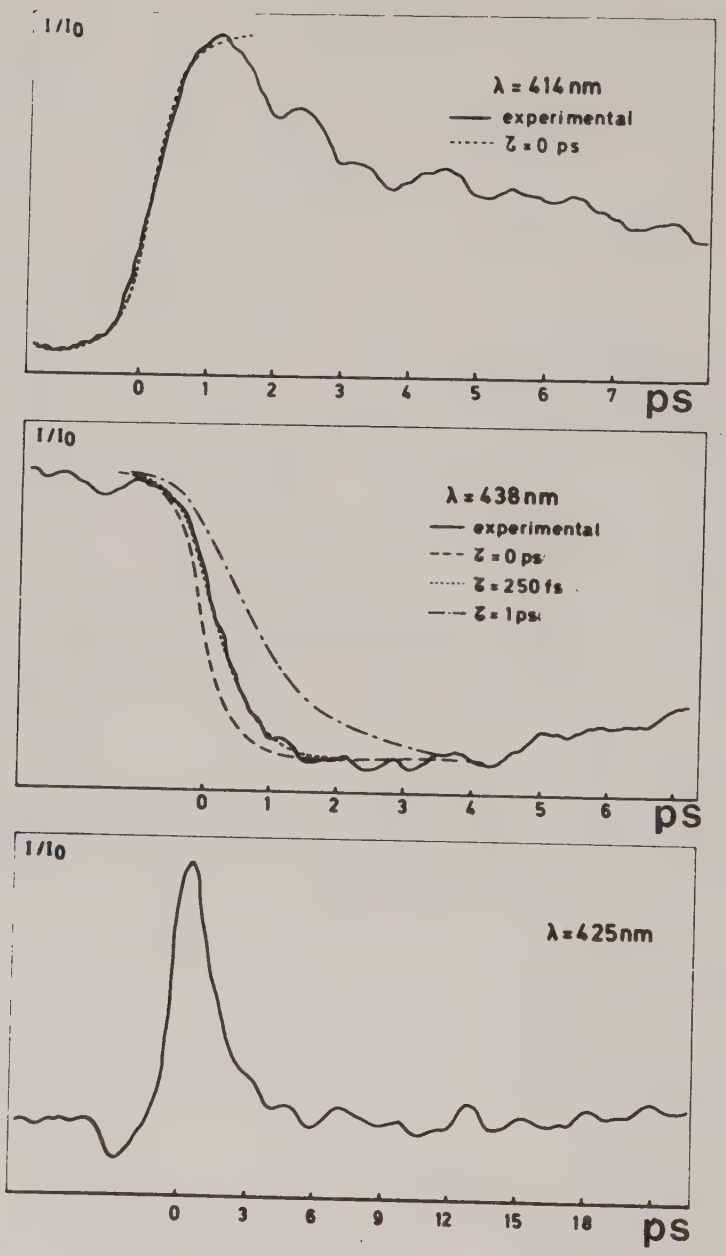


Figure 49 : Haut : Transmission induite à 414nm ;
(——) courbe expérimentale
(...) ajustement correspondant à une réponse instantanée.
Milieu : Absorption induite à 438 nm ;
(——) courbe expérimentale
(---) ajustement instantané
(—·—) ajustement pour une réponse hypothétique τ = 1 ps .
Bas : Caractérisation de l'évolution de l'état excité au point isosbestique (425 nm)

sorption induite n'est pas instantanée, mais s'accorde au mieux avec une fonction de réponse exponentielle de constante de temps τ = 250 fs . Le spectre différentiel ΔA initial correspondant à des délais entre 1 et 4 ps est montré dans la figure 48 (voir le spectre 4 ps). Cette courbe démontre la formation d'une espèce Mb déligandée avec une bande d'absorption élargie (s'étendant jusqu'à 470 nm) par rapport au spectre Mb stable. Cette espèce transitoire relaxe entièrement vers un produit Mb stable dans les 5 ps suivantes (spectre ΔA + 9 ps). La constante de décroissance de cette espèce excitée est de 1,4 ps mesurée à partir des cinétiques de variation d'absorption près du point isosbestique (424,5 nm). Comme on le voit sur la figure 48 , on ne note plus aucune variation de forme du spectre ΔA dans les temps les plus longs. Cependant, on observe simultanément une décroissance du blanchiment à 414 nm et de l'absorption induite à 438 nm pendant les 200 ps suivantes. Ce processus est mieux quantifié par des mesures de cinétique dans des échelles de temps de 0 à 200 ps comme exposé (figure 50) . Ces courbes démontrent l'existence d'un processus de recouvrement à deux étapes, une étape rapide décrite auparavant comme un processus de relaxation, et une plus longue τ = 100 ps qui, à cause de ces effets symétriques, peut être attribuée à un processus de recombinaison.

4.3.4. Discussion

Les résultats que nous venons d'exposer démontrent qu'après son excitation à 307 nm, le processus de photodissociation de MbO_2 passe initialement par un état ligandé excité à courte durée de vie qui relaxe (τ = 250 fs) en un état excité déligandé Mb, comme le démontre l'apparition d'un spectre ΔA décalé vers le rouge, et comme le démontrent aussi les cinétiques. Ces résultats suggèrent aussi que l'espèce excitée Mb^* relaxe suivant deux chemins en compétition :

1) vers une espèce stable Mb (τ = 3,5 ps) comme le montre l'évolution du spectre ΔA autour de 450 nm

2) et simultanement vers l'état fondamental de l'espèce ligandée comme le montre le recouvrement partiel du blanchiment à 414 nm pendant les premières 9 ps .

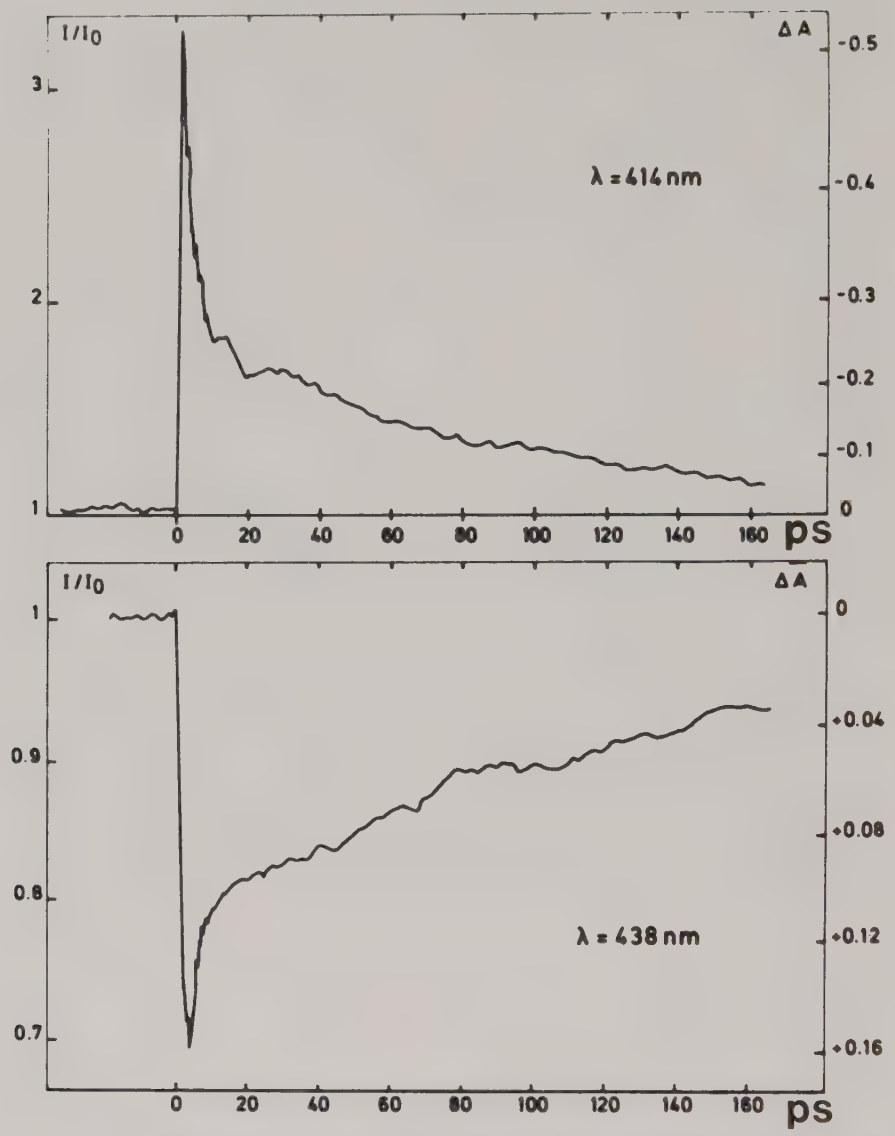


Figure 50 : Transmission induite (haut) et absorption induite (bas) après photoexcitation de MbO_2.

Notre étude démontre aussi l'existence d'une recombinaison géminée à constante de temps τ = 100 ps et qui suit les processus ultra-rapides précédents. Cette recombinaison concerne approximativement 80 % de l'espèce stable Mb initialement photodissociée. Ces conclusions sont résumées dans le diagramme (figure 51) . Dans ce modèle, toutes les valeurs ont été déduites, soit directement des cinétiques, soit des rapports de branchement. Ceci a conduit à postuler deux comportements pour les molécules d'oxygène puisque la recombinaison géminée ne concerne approximativement que 8 % des molécules initialement déligandées. On peut postuler que la première population représente les molécules d'oxygène très proches de l'hème (O_{2in}) alors que la deuxième population représente les molécules d'oxygène qui ont migré loin (ou même hors) de la poche de l'hème (O_{2out}). Ce modèle implique donc des rendements quantiques différents à chaque étape du processus. A l'étape initiale de l'apparition de l'espèce déligandée Mb^*, Φ_1^* est proche de 0,8. A l'étape suivante correspondant à l'apparition de l'espèce stable Mb, Φ_2 est proche de 0,4. Et finalement, après la recombinaison géminée, Φ_3 est égal à à 0,3, valeur en très bon accord avec celle mesurée à l'équilibre (à l'échelle de temps de la milliseconde) . Les mesures de cinétique de spectroscopie publiées par Reynolds et al (1981) diffèrent notablement de nos résultats dans le sens que ces auteurs ont observé un retard de l'absorption induite (10-15 ps) à 440 nm comparativement au blanchiment à 420 nm pendant l'excitation (5-10 ps). Ces différences sont probablement dues à leur longue durée d'impulsion (8 ou 25 ps) et à leur énergie d'excitation. Cornelius et al(1981) ont, eux, publié des différences de spectres transitoires après photolyse de la MbO_2 utilisant des impulsions à 355 nm de durée 6 ps . Nos spectres initiaux ΔA sont similaires aux leurs dans le sens qu'ils observent aussi un décalage de bande vers le rouge qu'ils ont attribué à la formation d'une espèce Mb^*. Cependant, bien qu'il leur ait été difficile de discriminer entre des effets de dispersion de vitesse de groupe et des cinétiques d'apparition de nouvelles espèces, ils ont proposé une durée de vie τ = 13 psec pour une espèce intermédiaire pendant le processus photolytique. Nous venons de démontrer qu'en fait, cette première étape est beaucoup plus rapide (τ = 250 fsec), et ne nécessite pas un processus à deux étapes. Ces différences peuvent peut-être être expliquées par les longueurs d'onde différentes d'excitation. Ainsi, à 307 nm, pourrait être peuplé directement un état

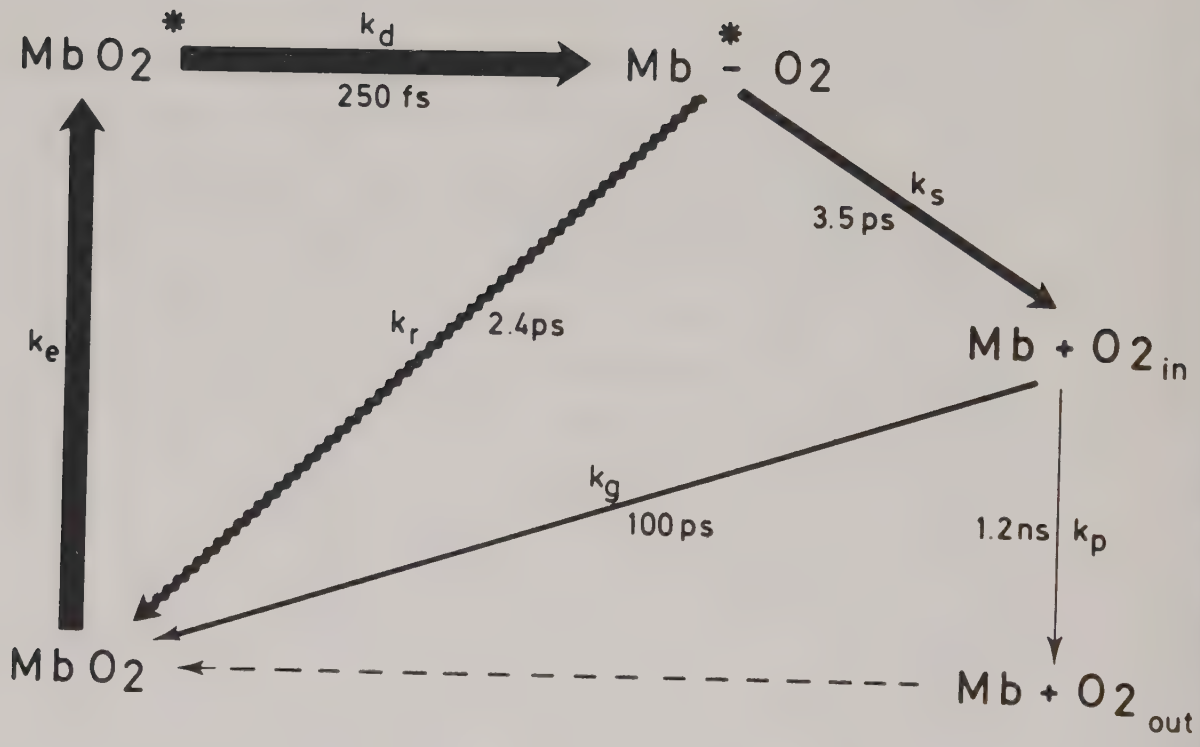


Figure 51 : Schéma simplifié du processus photolytique après photoexcitation de MbO_2 .

excité MbO_2 hautement photodissociatif. Il est, par contre, bien plus difficile de comprendre la cinétique de relaxation $Mb^* \rightarrow Mb$, publié par Cornelius et al (1981)(k_6 dans leur modèle), et les raisons pour lesquelles ils n'ont observé aucune recombinaison géminée significative. Ceci est peut-être dû à leur résolution temporelle limitée par leur impulsion de 6 à 8 psec. La comparaison des processus photolytiques dans le MbO_2 par rapport à ceux observés dans le MbCO confirme la grande différence des interactions de ces deux ligands avec le site hémique dans les hémoprotéines .Dans le MbCO, nous avons trouvé une constante de temps de 350 fsec pour le processus photolytique, mais aucun indice d'une espèce déligandée Mb^* et aucune recombinaison dans les 200 ps après l'excitation. Ces différences illustrent la variation des distributions électroniques dans l'hème, suivant la nature du ligand, et/ou leur comportement dans la poche de l'hème, après la photodissociation .

4.4. ANALYSE SPECTRALE FINE ET CINETIQUES A HAUTE RESOLUTION

4.4.1. Introduction

Nous avons,dans cette dernière partie,utilisé au mieux l'avantage d'une résolution temporelle récemment améliorée (50 Fs), jointe à une précision de 5 Å sur la détermination des longueurs d'onde, pour mesurer les influences spectrale et cinétique de la présence de différents ligands axiaux du fer.

Ainsi, nous avons analysé l'incidence sur les spectres ΔA transitoires de la présence avant photolyse de O_2 ou de CO en 6ème position de coordination, soit encore du remplacement, à la 5ème position de coordination, de N_ε(His F 8) par un ion chlorure (dans le protohème).

Nous avons vu chapitre 2, que des informations qualitatives sur l'interaction de la liaison axiale Fe-N_ε peuvent être obtenues à partir des spectres ΔA dans le domaine de la bande de Soret. Une plus étroite interaction dans la liaison Fe-N_ε(His F 8), consécutive à une transition de l'état de spin du fer ou à des facteurs stériques, produit dans la zone spectrale d'apparition de l'espèce déligandée, un déplacement vers le rouge de la bande d'absorption.

Nous présentons dans ce paragraphe des données de cinétique femtoseconde et des spectres de différences d'absorption (ΔA) obtenus après photodissociation des hémoprotéines ligandées par O_2 ou CO : HbO_2, HbCO, MbO_2, MbCO et du protohème (chloro-hème-CO).

Nous confirmons avec cette haute résolution, l'apparition d'espèces déligandées avec une constante de temps de 250 Fs(O_2) ou 300 Fs(CO). Cependant, nous résolvons maintenant l'existence d'un déplacement du spectre vers le rouge de 3 à 4.5 nm, par rapport aux espèces stables, déplacement non observé dans le cas du protohème-CO photodissocié.

Ainsi, ce déplacement vers le rouge du spectre d'absorption caractérisant l'espèce déligandée, qui apparaît avec une cinétique propre (τ=250 Fs), semble être rélié à la présence du N_ε de l'imidazole de His F 8 " rigidifié " par la protéine. Nous verrons en conclusion que ceci nous conduit à suggérer que les spectres ΔA femtosecondes révèlent un état où l'atome de fer, après déligandation instantanée , sort du plan moyen de l'hème, avec une cinétique $\tau_{Fe} \sim$ 250 Fs. Ceci entraîne une situation transitoire où l'histidine proximale

est encore en conformation ligandée et où le fer déligandé est déjà en dehors du plan de l'hème, la conséquence étant une déformation angulaire de l'imidazole et une augmentation de l'intéraction Fe-N_ε(His F 8).

4.4.2. Expérimentation et résultats

L'influence éventuelle de la longueur d'onde d'excitation a été évaluée en utilisant des impulsions à 309 nm et à 580 nm.

Les expériences suivantes ont donc été réalisées avec deux configurations du système femtoseconde.

Brièvement (voir chapitre précédent), dans une des configurations, la moitié de l'énergie issue de l'amplification est utilisée pour produire un continuum femtoseconde, l'autre partie est focalisée sur un cristal de KDP (épaisseur 1.5 mm) pour obtenir, à 309 nm, des impulsions de 20 µJ et 100 Fs. L'autre configuration consiste à produire un deuxième continuum,en focalisant dans une cuve d'eau de 2 cm, mis à la place du KDP. Une partie spectrale de ce continuum est alors sélectionnée et amplifiée à une puissance de l'ordre du gigawatt (§ 3.6). Nous avons alors utilisé l'accordabilité du système pour ajuster la fréquence d'excitation juste au-dessus du canal présumé de dissociation dans les carboxyhémoprotéines.

Ainsi nous présentons des cinétiques et des spectres transitoires après excitation par des impulsions de 100 Fs soit à 309 nm, soit à 580 nm. Dans ces deux types d'expériences, l'énergie des impulsions a été ajustée pour être comparable.

Les échantillons ont été préparés de manière similaire à celle décrite précédemment. Les solutions d'hémoglobine purifiée sont préparées à partir de sang frais, par chromatographie DEAE Sephadex et diluées dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7 ou 8. La myoglobine (sperm whale type II ou horse heart type III de Sigma) est préparée par le procédé de Rothgeb et Gurd (1978). Le protohème est préparé à partir de l'hémine (Fe^{3+}. protoporph. Cl^-) comme indiqué § 4.2.2, dans un mélange de polyéthylène glycol et de NaOH 1N (94 :6, vol : vol). Les échantillons de solutions mères sont dilués jusqu'à obtenir, au maximum de la bande de Soret, une absorbance de 2.2 à 2.4 dans une cuve de 0.05 cm de trajet optique. Pendant la durée de photoexcitation, la cuve est déplacée horizontalement de façon que

chaque impulsion à 10 Hz excite une nouvelle région de l'échantillon.

La figure 52 révèle les cinétiques femtosecondes de changements d'absorption après photodissociation de HbO_2 à 309 nm. Les cinétiques obtenues après excitation à580 nm sont superposables à celles-ci. Les modifications d'absorption ont été mesurées à 414 nm et à 431 nm , correspondant respectivement au maximum d'absorption de la bande de Soret de HbO_2 et de Hb (en fait 431 et 414 nm correspondent plus exactement aux maxima (±) du spectre ΔA stable). La cinétique à 414 nm (augmentation de transmission) correspond donc à la disparition de l'espèce ligandée; elle est instantanée, c'est à dire limitée par la durée de l'impulsion. L'absorption induite à 431nm apparait,avec une constante de temps de 250 Fs (figure 52).

Cette constante de temps ne peut être due à une dispersion de la vitesse de groupe qui intervient comme un retard pur et qui est prise en compte dans la position du zéro.

L'analyse spectrale est présentée figure 53, où sont donnés les spectres de différences transitoires entre 0.4 ps et 10 ps, après photodissociation (le zéro est pris à 455 nm).L'analyse des spectres ΔA dans la zone 435-470 nm révèle la présence d'une espèce excitée dont l'absorption s'étend jusqu'à 470 nm, avec un maximum vers 455 nm. L'apparition de cette espèce coïncide avec le blanchiment à 414 nm, c'est à dire qu'elle est instantanée (figure 54). On note aussi que pour des conditions expérimentales parfaitement identiques, les cinétiques d'apparition de l'espèce Hb déligandée, après photodissociation de HbCO et de HbO_2, sont superposables.

Noter la déformation figure 53 du spectre ΔA à + 0.4 ps très sensible à la dispersion de la vitesse de groupe, comme l'indique le déplacement du point isosbestique. Il faut aussi remarquer que le pic positif des spectres ΔA de 2 à 10 ps, se trouve à 435 nm, c'est à dire déplacé de 4 nm vers le rouge par rapport au spectre ΔA stable.

L'apparition instantanée de l'état excité vers 455 nm (Figure 54) est suivie par une phase de relaxation qui conduit vers + 10 ps, à un spectre ΔA symétrisé. La cinétique de relaxation de cet état excité est caractérisée par une constante de temps τ_r= 1.5 ps. C'est donc la présence de cet état excité qui est responsable de l'élargissement du spectre ΔA vers 450-470 nm.

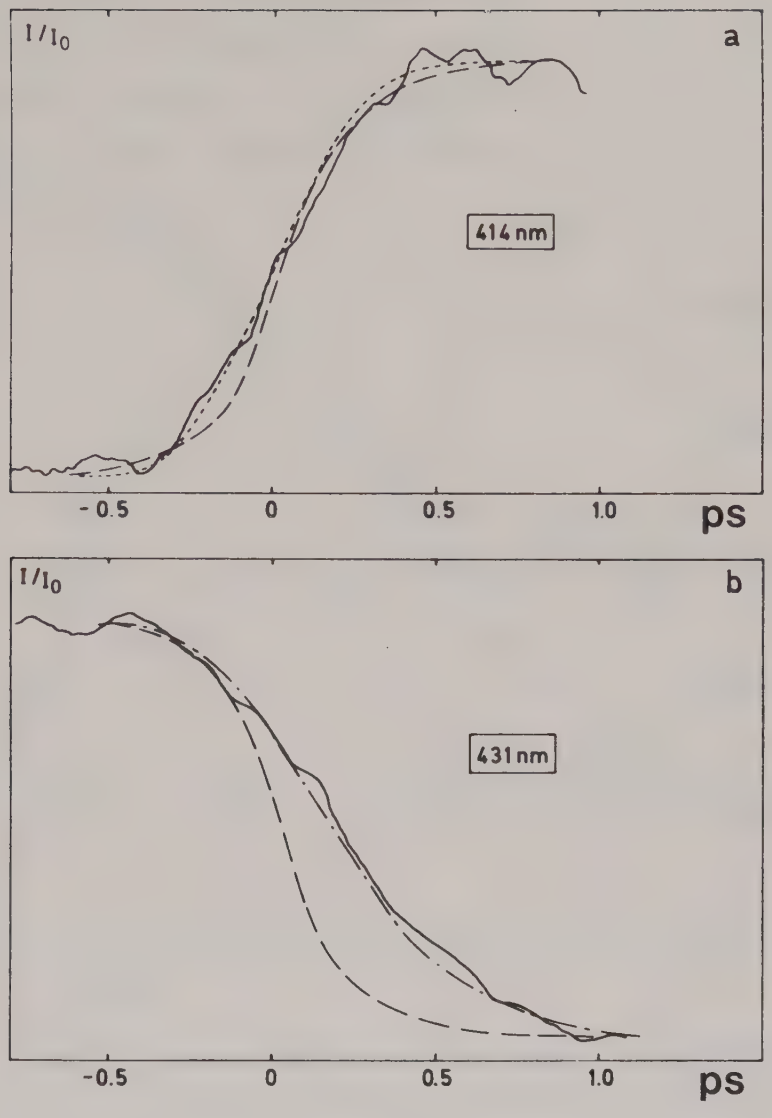


Figure 52 : Transmission et absorption induites normalisées après photodissociation de HbO_2 par des impulsions à 309 nm de 100 Fs (mêmes cinétiques à 580 nm)

a) en trait plein : transmission induite (I/I_o) à 414 nm indiquant une cinétique limitée par la durée de l'impulsion, comme le révèle la courbe (-----) qui représente l'intégrale de la corrélation croisée. La courbe (— —) est le meilleur ajustement de la courbe expérimentale en trait plein, en supposant une impulsion exponentielle de 105 Fs et un blanchiment instantané.

b) absorption induite à 431 nm, correspondant à l'apparition

de la déoxyhémoglobine. La courbe en trait plein est expérimentale. Les courbes (— —) et (—·—) correspondent respectivement à la réponse instantanée (comme en a)) et au meilleur ajustement avec une constante de temps τ_{Fe}=250 Fs.

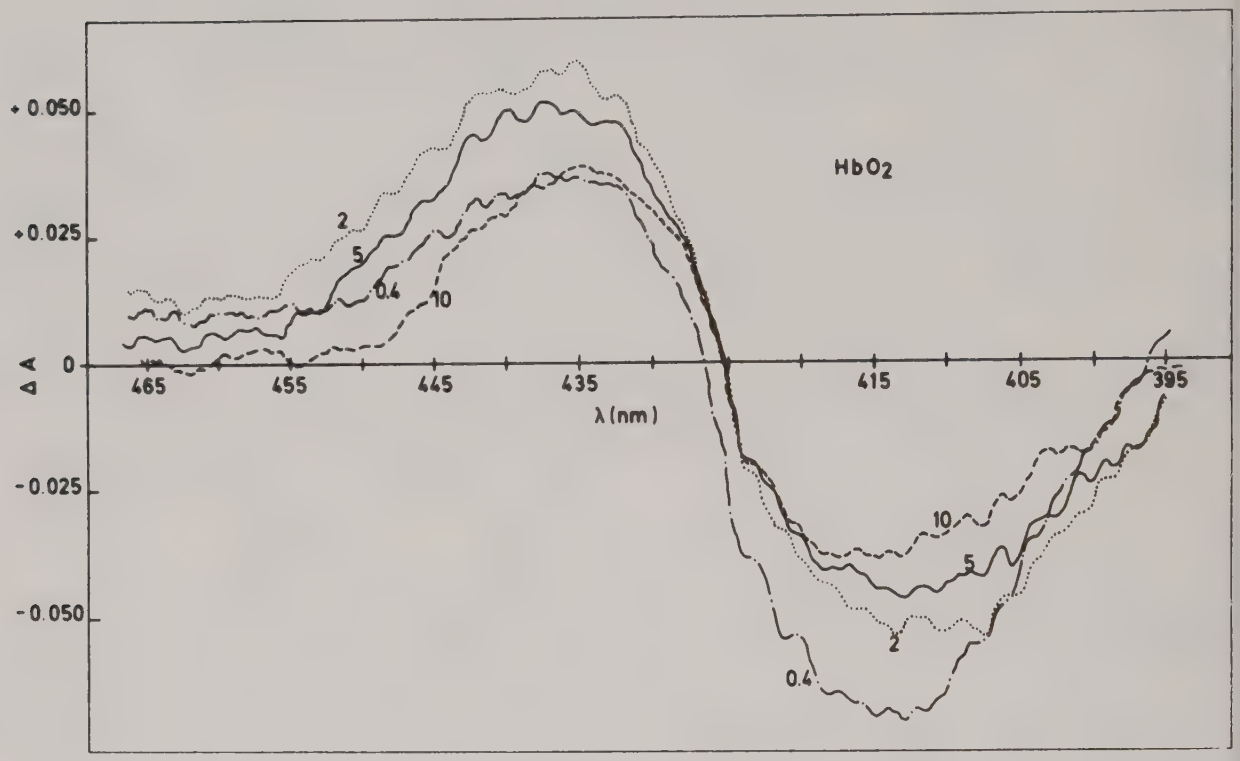


Figure 53 : Spectres transitoires de différences après photoexcitation de HbO_2. Les courbes (—·—) , (·····), (——) et (-----) correspondent respectivement à + 0.4 ps, + 2ps, + 5 ps et + 10 ps après excitation par des impulsions de 100 Fs à 580 nm.

A + 10 ps cet état a complètement relaxé vers HbO_2 comme l'indique la relaxation concomitante vers 414 nm.

L'espèce dissociée existant encore à + 10 ps entraîne donc un spectre ΔA très proche de celui induit par une espèce Hb stable, excepté un décalage vers le rouge de 4 nm.

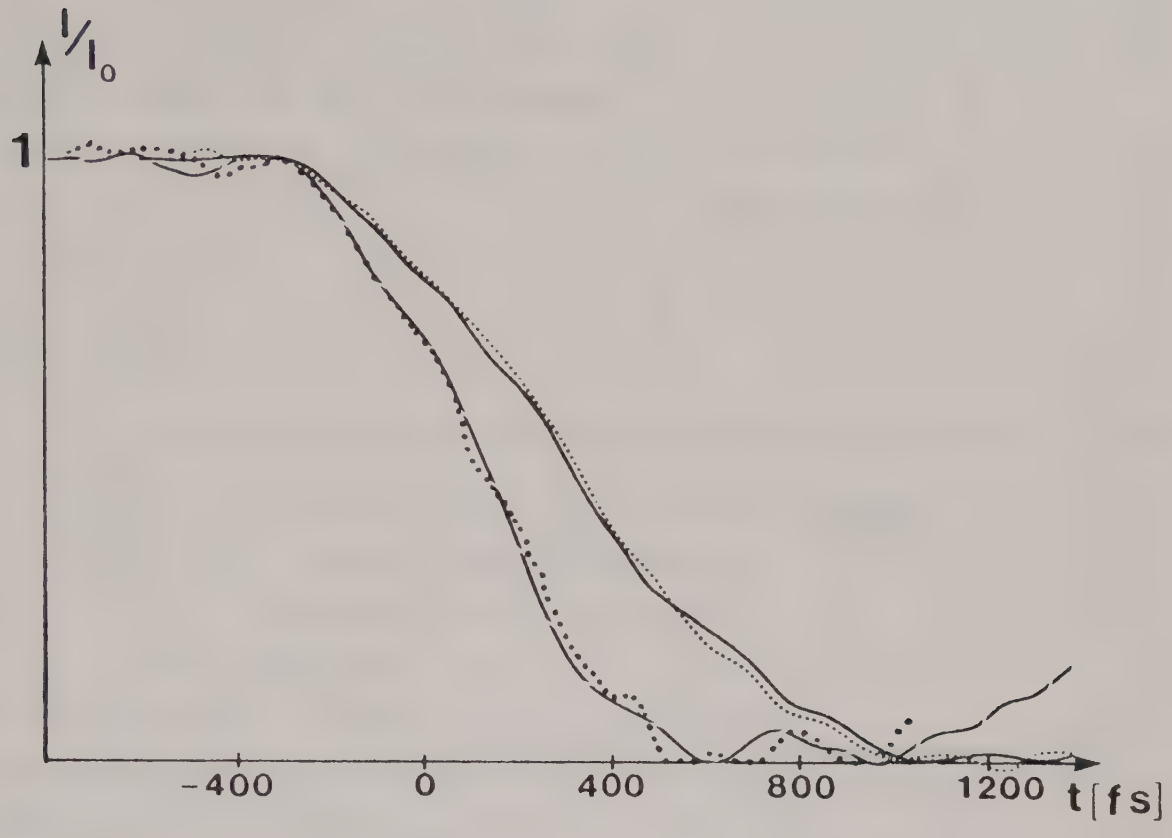


Figure 54 : Cinétiques femtosecondes après photodissociation de HbO_2 et HbCO.

HbO_2 : transmission induite (- ΔA) à 414 nm (·····) et absorption induite à 455 nm (–·–) et à 433 nm (———)

HbCO : absorption induite à 433 nm (▪▪▪▪▪▪▪)

L'analyse systématique de la position du maximum positif des spectres ΔA après photodissociation de Mb et de Hb ligandées avec O_2 ou CO, révèle sans restriction, la présence d'un déplacement vers le rouge de quelques nanomètres en comparaison du spectre ΔA stable correspondant (tableau 9).

Cette espèce déligandée caractérisée par un décalage vers le rouge de son spectre, persiste jusqu'à 500 ps, limite supérieure de notre temps d'observation. Cependant, les hémoprotéines ligandées avec O_2 se distinguent d'une ligandation CO par la présence d'une phase de recombinaison subnanoseconde.

(nm)	Protohème CO	Mb CO	MbO_2	HbCO	HbO_2
λ(ΔA max) stable	425.5	438	437	431	431
λ(ΔA max + 2 ps	425.0	441	440.5	435.5	435
Δλ	-0.5	+3.0	+ 3.5	+4.5	+4.0

Tableau 9 : Position du maximum positif des spectres ΔA à + 2ps en regard du maximum ΔA stable. Valeurs indépendantes de la longueur d'on d'excitation (309 nm ou 580 nm).

Nous avons vu pour MbO_2, que cette phase est caractérisée par une constante de temps τ = 100 ps et correspond à une recombinaison géminée.

Pour HbO_2, nous avons aussi démontré l'existence d'une recombinaison géminée. Cette phase est révélée,Figure 55,par la composante de recombinaison lente qui fait suite au pic initial de recouvrement correspondant au retour de l'état excité en 1.5 ps. Cette figure montre clairement que ce processus de recouvrement n'est pas exponentiel. Ainsi, dans une tentative d'ajustement exponentiel pour la phase lente, la combinaison donnant le meilleur résultat correspond à τ_r=1.1 ps(relaxation état excité dans l'encart fig. 55) et à τ_g = 200 ps. Mais pour que cet ajustement soit satisfaisant à la fois dans la phase initiale (0-6 ps) et dans le processus ultérieur (10-400 ps), il a fallu modifier l'importance relative des 2 composantes.

Ceci démontre que l'ajustement exponentiel pour la phase de recombinaison géminée n'est pas approprié. Si l'on revient aux travaux théoriques de cheminement du ligand dans l'environnement de l'hème (Karplus), nous avons vu qu'il existe un chemin (au moins) privilégié de diffusion du ligand.

Nous pouvons donc postuler l'existence d'un processus de recombinaison suivant un modèle simple. Dans ce modèle, les voies privilégiées de

de la théorie de la dynamique moléculaire, sont traduites par l'hypothèse d'un cheminement aléatoire du ligand dans un processus de diffusion à une dimension, suivi d'une recombinaison géminée.Un tel processus possède une solution analytique qui est :

$$N(t) = N_d(t) \quad \text{erf} \left[(\tau_d / t)^{1/2} \right]$$

avec $$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp - t^2 \, dt$$

τ_d^{-1} représente un taux de diffusion .

Un tel processus de diffusion aléatoire peut être, dans un modèle à 3 dimensions, ajusté avec une fonction:

$$\exp - (t/\tau_g)^{1/2}$$

Nous présentons figure 56 ces différents ajustements.

Nous pouvons conclure que la photodissociation de HbO_2 conduit à deux types d'espèces ayant leur propre évolution cinétique:

i) une espèce excitée ayant une absorption 455 nm-470 nm, apparaissant en moins de 100 Fs et qui relaxe vers HbO_2 avec $\tau_r \simeq 1.5$ ps .

ii) une espèce déligandée du type Hb stable mais possédant une bande d'absorption décalée d'environ + 4nm et qui apparait avec une constante de temps de 300 Fs $\pm$ 50 Fs. Cette espèce type Hb subit un processus de recombinaison géminée contrôlé par un mécanisme de diffusion à une dimension, de O_2.

Cette espèce de type Hb qui subit un processus de recombinaison géminée et qui est caractérisée par un spectre d'absorption décalé vers le rouge (+ 4 nm) est identifiée par le label Hb^+ dans le schéma simplifié du processus photolytique (figure 57).

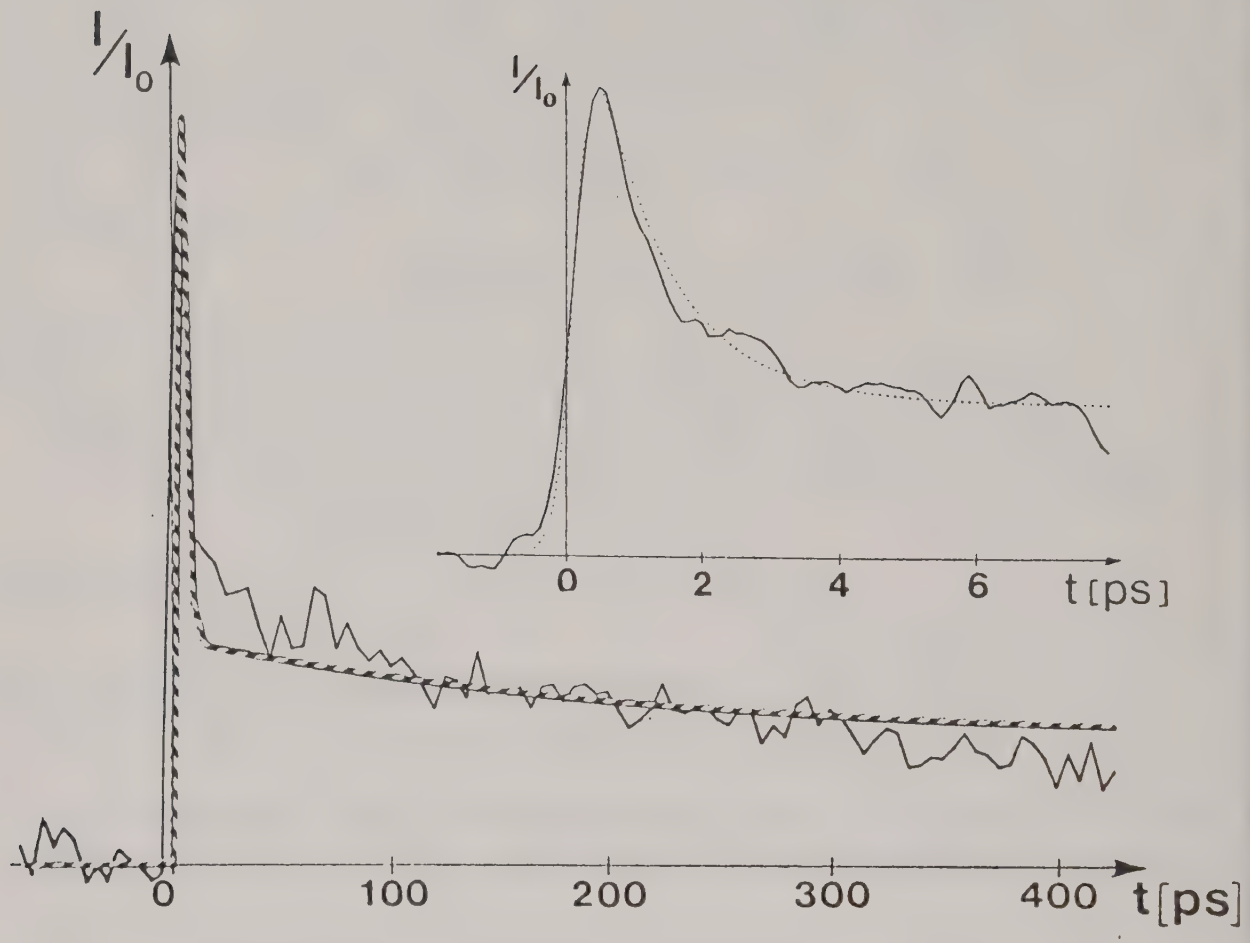


Figure 55 : Transmission induite à 414 nm dans HbO_2 après photodissociation à 580 nm. La courbe (——) est expérimentale et la courbe (·–·–) est le meilleur ajustement exponentiel (τ_g=200 p
On voit clairement qu'un ajustement exponentiel n'est pas satisfaisant. L'encart indique la phase initiale expérimentale (——) et le meilleur ajustement exponentiel (·····) :

τ_r=1.5 ps.

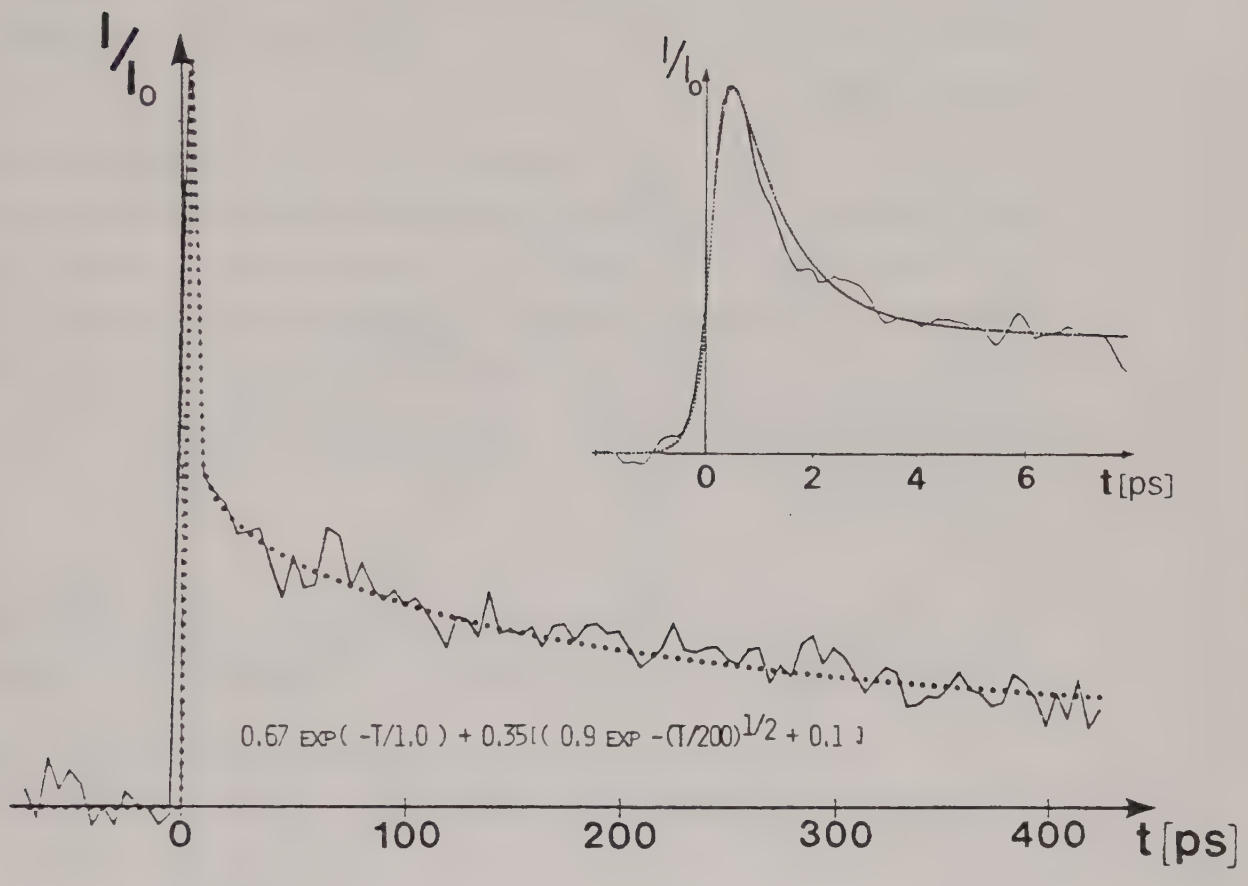


Figure 56 : courbes expérimentales : idem à figure 55. Essais d'ajustements type diffusion aléatoire (·····).

L'ensemble des caractéristiques spectroscopiques de Hb^+ favorise l'interprétation suivante :

i) la cinétique d'apparition de 300 Fs correspond au mouvement du fer en dehors du plan de l'hème entraînant un renforcement de l'intéraction Fe-N_ε (His F 8) et une déformation de l'imidazole (décalage vers le rouge).

ii) ce canal photodissociatif est en compétition avec une voie état excité (Hb^*) que nous proposons comme étant une espèce déligandée (Fer dans le plan de l'hème ?). L'identification de cet état excité comme étant une espèce dissociée est supportée par l'analyse du spectre d'un population initiale Hbdeox photoexcitée. L'excitation de Hb provoque une absorption dans le même domaine spectral que Hb^* (450-470 nm) et avec la même évolution temporelle (τ apparition < 100 Fs, $\tau_r \simeq$ 1.5 ps). (figure 58).

iii) la phase de relaxation " lente " correspond à un processus de recombinaison géminée obéissant à une loi de diffusion aléatoire du ligand suivant un cheminement privilégié (diffusion à une dimension).

Nous proposons le schéma simplifié figure.57 comme résumé synthétique de l'ensemble des phénomènes.

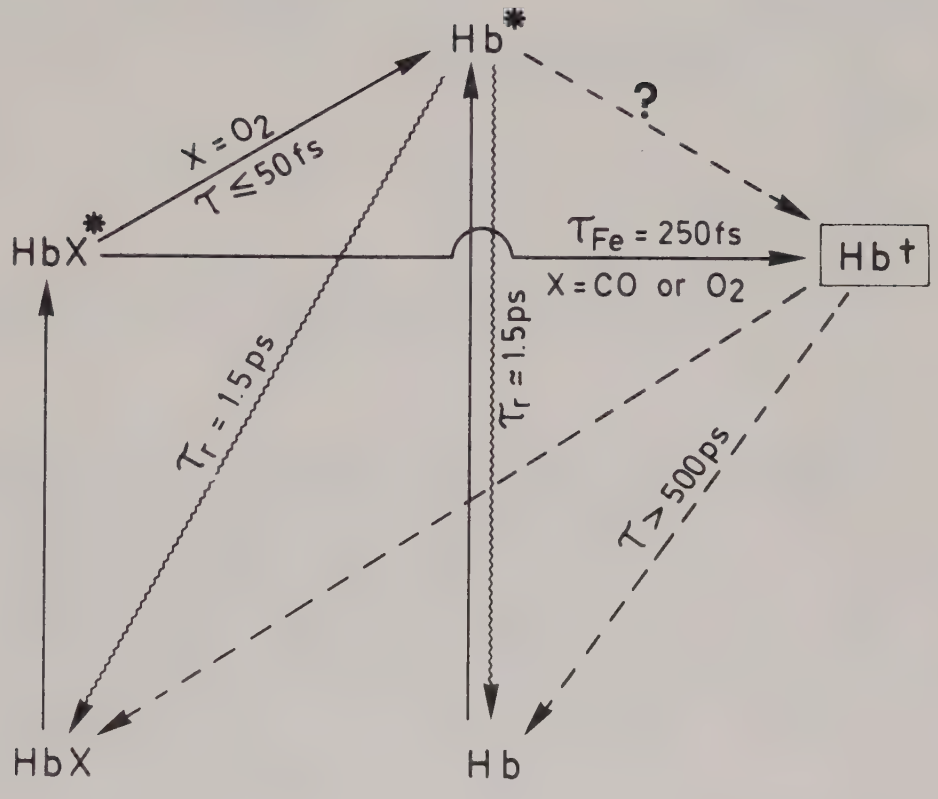


Figure 57 : Représentation simplifiée des trajets de photolyse de HbO_2 après excitation par des impulsions de 100 Fs à 580 nm ou 309 nm. HbX^* symbolise un état ligandé excité photo-dissociatif au-dessous de la bande Q. X indique soit CO, soit O_2. Hb^* est l'espèce excitée qui absorbe dans la région 450-470 nm. Hb^+ est l'espèce déligandée possédant un spectre d'absorption décalé de + 4 nm par rapport à Hb stable. Hb^+ représenterait en fait une espèce Hb en conformation " T " au niveau de l'hème, mais en conformation " R " au niveau de la protéine.

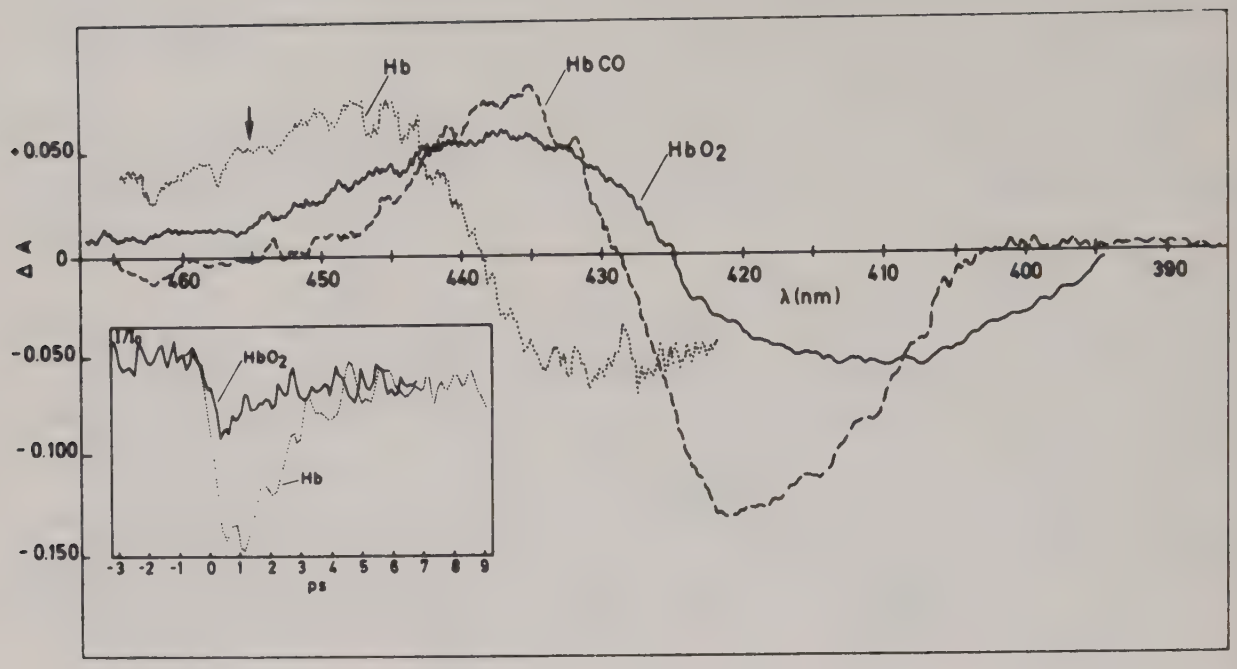


Figure 58 : Spectres transitoires de différences enregistrés 2 ps après l'excitation de Hb O_2 (——), HbCO (— — —) et de deoxy Hb (.....). Remarquer l'absorption induite vers 450-470 nm dan la deoxy Hb et dans HbO_2, mais qui est absente (ou inférieure à 0.008 DO)pour HbCO photodissocié. L'encart montre l'amplitude relative, à 455 nm (voir la flèche), de cette absorption pour Hb et HbO_2. On observe une évolution temporelle similaire.

4.5. SPECTROSCOPIE FEMTOSECONDE DES NITROSYLHEMOPROTEINES

4.5.1. Introduction

Nous présentons ici des résultats préliminaires de spectroscopie femtoseconde de dérivés nitrosylés : HbNO et MbNO.

Les expériences de photodissociation de ce ligand sont peu nombreuses dans la littérature, car il est réputé possèder un rendement quantique de dissociation très faible(Gibson et Ainsworth, 1957; Antonini et Brunori, 1971). La valeur après photolyse microseconde, donnée par ces auteurs est 0.001 (en comparaison $\emptyset$ HbO_2= 0.008). Par contre, de nombreux travaux de résonance électronique paramagnétique ont été réalisés.

Ils ont apporté des informations détaillées sur la stéréochimie et la structure électronique du groupe nitrosylhème (Chien 1969, Dickinson et Chien, 1973). L'hétérogénéité dans la réactivité des chaînes lors d'une transition quaternaire R-T a été révélée par Henry et Banerjée (1973), Nagaïet coll (1978) Szabo et Perutz (1976). Des travaux avec des hybrides (Henry et Banerjee, 1973; Banerjee, Stetzkowski et Henry, 1973) ont conforté cette idée que les modifications tertiaires dans les chaînes α ont un retentissement important au niveau de l'hème, alors que dans les chaînes β, une transition R-T n'a que peu d'influence sur l'hème. Les chaînes β semblent néanmoins jouer un rôle important dans le déclenchement de la transition quaternaire.

Ainsi,la possibilité de réaliser une transition quaternaire dans HbNO par un changement de pH et par addition d'inositol hexaphosphate (IHP), en fait un très bon modèle pour l'étude des propriétés allostériques de l'hémoglobine.

Nous avons, dans une première étape, réalisé la spectroscopie femtoseconde de MbNO et HbNO. Celle-ci a révélé un schéma photolytique semblable dans les deux cas à celui de HbO_2. Cependant, nous avons révélé une phase de recombinaison pour NO,inexistante (ou très différente) dans le cas de HbO_2. Par ailleurs nous avons montré que les comportements de HbNO et MbNO sont très différents dans cette phase de recombinaison.

4.5.2. Résultats et discussions

Les cinétiques femtosecondes de photodissociation de HbNO et de MbNO sont présentées figure 59. Ces cinétiques correspondent à l'évolution de la bande de Soret et plus précisément à la disparition de l'espèce ligandée, mesurée au maximum négatif de ΔA stable(416 nm pour HbNO et 420 nm pour MbNO) et à l'apparition de l'espèce déligandée(courbes inférieures) mesurée par l'absorption induite à 432 nm pour HbNO et à 438 nm pour MbNO (max positif du spectre ΔA stable).

Sur cette figure, nous avons d'autre part superposé le meilleur ajustement correspondant à une impulsion de 110 Fs de durée. Nous voyons, comme pour les autres ligands, que la photodissociation de NO est instantanée (partie supérieure), et que par contre l'apparition de l'espèce déligandée possède une cinétique propre de τ_{app} = 300 Fs. Notons que dans la cinétique à 432 nm pour HbNO, la courbe est biphasique. Il existe une contribution initiale de blanchiment de la Soret ligandée, avant l'apparition d'une absorption induite. Ceci révèle deux phénomènes :

i) le déplacement du point " isosbestique " vers 432 nm entraînant dans la fenêtre spectrale d'analyse, une double contribution dans les premières centaines de femtosecondes. Ceci est parfaitement vérifié avec les spectres ΔA figure 60.

ii) la différence de cinétique entre le blanchiment instantané et l'absorption induite plus lente (τ_{app} = 300 Fs). Ce phénomène de dérivée pourrait d'ailleurs être utilisé comme méthode de mesure de la constante de temps τ_{app}. Il faut noter que cette double contribution pourrait laisser croire à une réponse quasi-instantanée à 432 nm. Il n'en est rien comme on peut le vérifier à 455 nm pour HbNO, où dans ce cas il existe une contribution importante de l'absorption de l'espèce déligandée et non pas de l'espèce excitée.

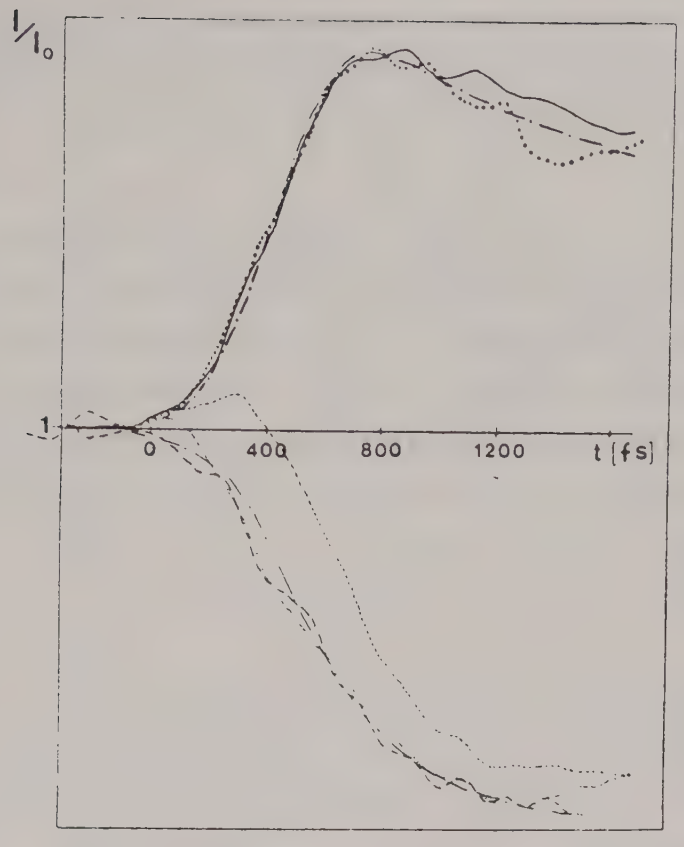


Figure 59 : Cinétiques femtosecondes des transmissions et absorptions induites normalisées après photodissociation de HbNO et MbNO par des impulsions à 580 nm de 100 Fs.

HbNO : transmission induite à 416 nm (——) et absorption induite à 455 nm (·····) et à 432 nm (-·-·-). Noter la forme biphasique de cette dernière cinétique (voir texte).

MbNO : transmission induite à 420 nm (·····) et absorption induite à 438 nm (– – –). Les courbes (—·—) et (——··——··——··) correspondent respectivement au meilleur ajustement à 420 nm (τ_p = 110 Fs, τ_r = 1.1 ps) et à 438 nm (τ_{app} = 300 Fs). Ces ajustements révèlent la similarité de réponse pour MbNO et HbNO.

L'analyse des spectres de différence dans la région de la bande de Soret nous confirme ces caractéristiques pour HbNO (Fig. 60). Ces spectres ont été enregistrés d'une part avec la technique de l'analyseur optique multicanal et d'autre part, point par point avec la technique des photodiodes. Ceci nous donne, en particulier dans la zone du point isobestique, une bien meilleure fiabilité et précision.

Il faut cependant remarquer que dans le cas de HbNO, nous n'avons pas réalisé un échantillonnage spectral systématique, en particulier entre 435 nm et 450 nm. Nous avons ainsi analysé la dépendance temporelle du spectr ΔA entre 0.5 ps et 5 ps.

On constate très nettement l'apparition d'une bande d'absorption très plate s'étendant au-delà de 470 nm simultanément à la disparition de l'espèce ligandée (+ 0.5 ps). Ceci entraîne le déplacement du point isosbestique vers 431.5 nm. On visualise ensuite l'arrivée progressive de l'espèc déligandée type stable par l'apparition de la bande d'absorption à 433 nm (+ 1, + 2 ps). Cette montée progressive du signal à 433 nm correspond à τ_{app} = 300 Fs. A partir de + 2 ps, on constate déjà la relaxation vers 455 nm avec son correspondant vers 416 nm (bande de Soret ligandée).

On note par ailleurs que le point isosbestique vient se fixer à 424.5 nm à partir de cet instant (t > 3 ps). La courbe à + 5 ps marque déjà le processus de recombinaison avec recouvrement de type symétrique à 433 et 416 nm sans déplacement du point isosbestique. Ce point invariant à partir de + 3 ps, est à + 1 nm par rapport à son correspondant dans le spectre ΔA stable. Ceci correspond à la valeur du décalage du maximum ΔA positif (433 nm au lieu de 432 nm). Il faut noter que c'est la valeur la plus faible trouvée jusqu'ici en dehors du protohème CO.

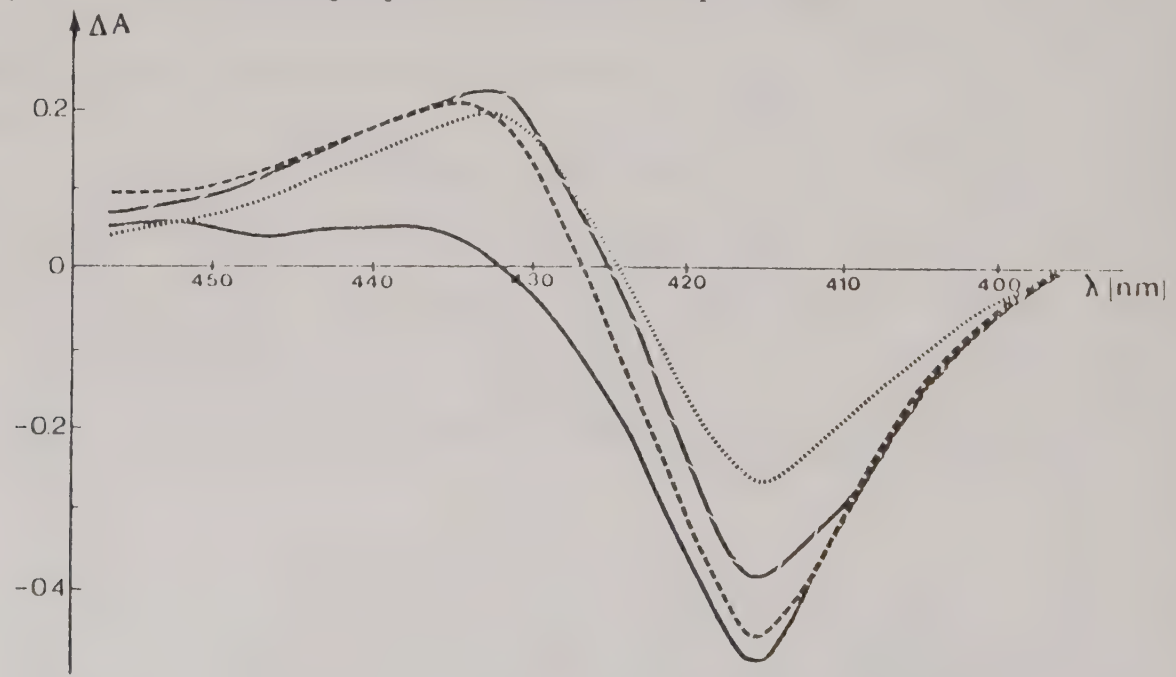


Figure 60 : spectres transitoires de différences après photoexcitation de HbNO à 580 nm avec des impulsions de 110 Fs. Les courbes (——), (▪▪▪▪▪), (– – –) et (· · · · ·) correspondent respectivement à + 0.5 p + 1 ps, + 2 ps et + 5 ps après photoexcitation. La position du point isosbestique est à 424.5 nm pour t > 3 ps.

De la même façon, nous avons enregistré les spectres de différences transitoires pour MbNO. Ces spectres sont présentés figure 61 pour des temps compris entre + 0.5 ps et + 50 ps après photoexcitation à 580 nm.

La grande précision dans l'enregistrement à + 0.5 ps nous permet de distinguer l'apparition d'une double bande d'absorption entre 434 et 465 nm. On distingue ensuite l'évolution de l'espèce type déligandée stable qui est caractérisée par une absorption induite qui atteint son maximum vers + 2 ps (τ_{app} = 300 Fs) . La relaxation de l'état excité vers 465 nm est déjà révélée à + 2 ps.Elle est beaucoup plus notable à + 10 ps et complète à + 50 ps. A cet instant on remarque la contribution du processus de recombinaison.

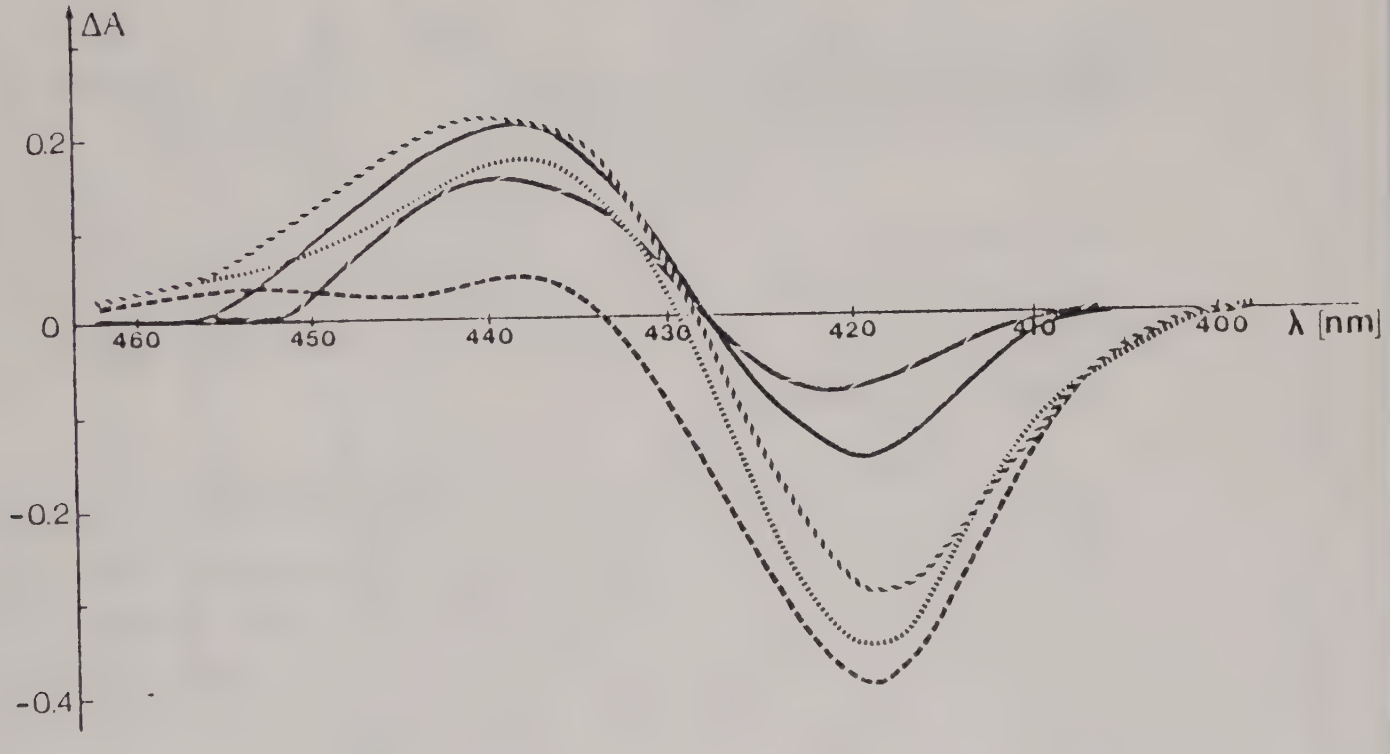


Figure 61 : Spectres transitoires de différences après photodissociation de MbNO. Les courbes (- - -), (·····), (- · - ·), (———) et (———) correspondent respectivement à + 0.5 ps, + 1 ps, + 10 ps et + 50 ps, après excitation à 580 nm avec des impulsions de 100 Fs. Noter la position invariante du point isosbestique à 429 nm à partir de + 2 ps.

Les cinétiques de recombinaison ont été résoluespar l'analyse des transmissions et des absorptions induites aux maxima négatifs et positifs des spectres ΔA. L'évolution de ces amplitudes est présentée figure 62 pour MbNO et HbNO entre - 80 ps et + 300 ps.

Cette figure révèle la différence de comportement entre MbNO et HbNO dans leur phase de recouvrement après photodissociation. De manière à quantifier cette phase de recombinaison nous avons réalisé différents types d'ajustements théoriques. En dehors de la phase de relaxation initiale qui se manifeste uniquement dans les transmissions induites, qui est caractérisée par $\tau_r \simeq 1.1$ ps(figure 59), nous avons tenté un ajustement monoexponentiel. Très significativement, cet ajustement s'est révélé inadéquat aussi bien pour MbNO que HbNO.

Dans le cas de HbNO, l'idée première qui vient à l'esprit, compte tenu de l'inégale réactivité des chaînes α et β, est un ajustement avec une combinaison linéaire de deux exponentielles.

C'est un tel ajustement qu'ont réalisé Cornélius et coll.(1983) où ils estiment deux valeurs $\tau_{X_1} = 17 \pm 4$ ps et $\tau_{X_2} \sim 100$ ps. Nous avons effectué le même type d'ajustement et nous obtenons, en conservant la terminologie de Cornélius et coll, $\tau_{X_1} = 12.5 \pm 0.5$ ps et $\tau_{X_2} \simeq 100$ ps, solution qui donne un ajustement satisfaisant.

Cependant, dans cette optique d'un comportement non symétrique suivant que les molécules de NO sont dissociées des hèmes α ou des hèmes β, l'ajustement dans le cas de MbNO devrait pouvoir être réalisé avec <u>une seule</u> constante de temps. Or, nous constatons qu'un tel ajustement monoexponentiel n'est pas satisfaisant dans le cas de MbNO, et que l'on doit utiliser $\tau_{X_1} = 12$ ps et $\tau_{X_2} = 100$ ps, avec cependant une contribution du processus X_1 beaucoup moins importante (voir légende figure 62).

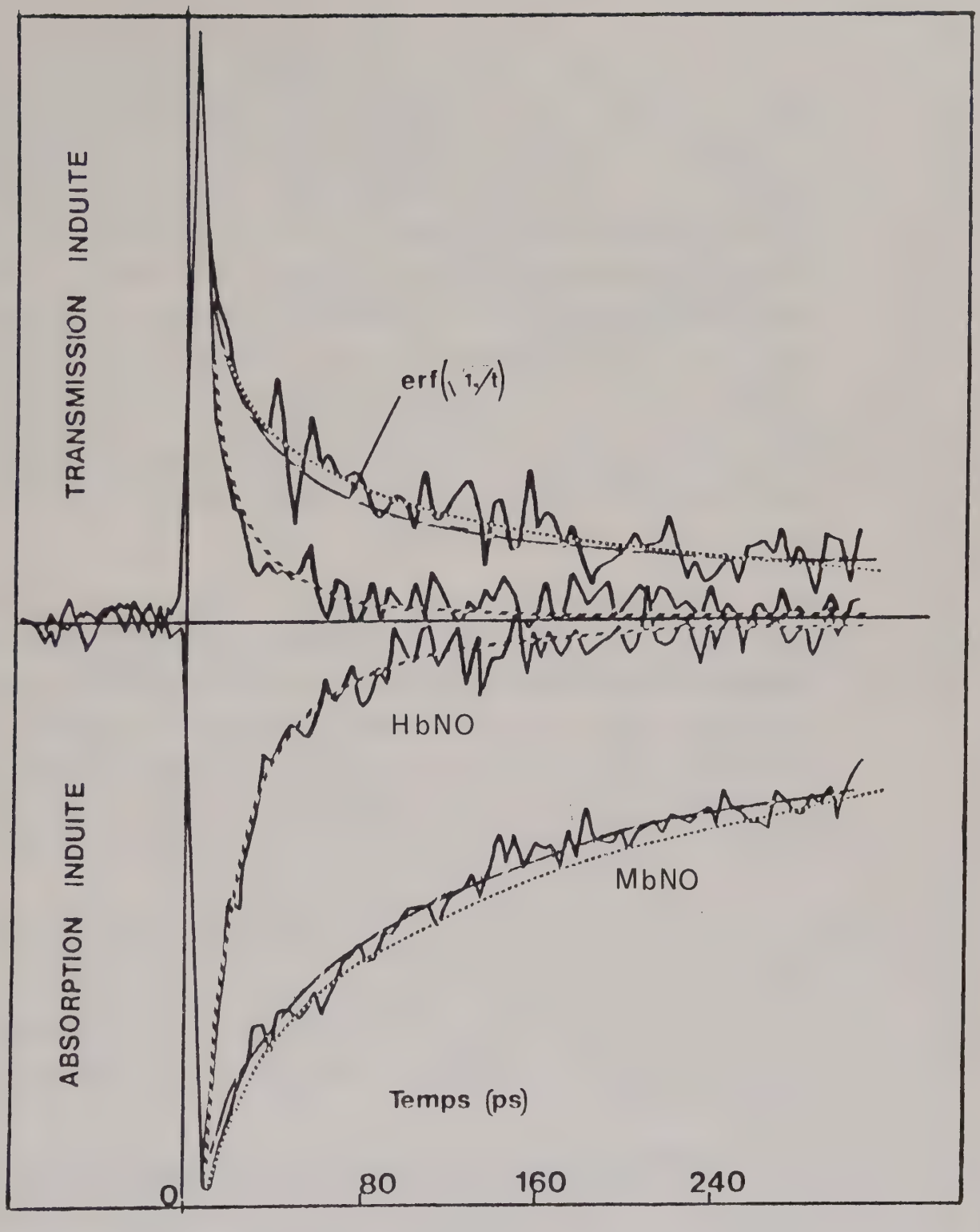


Figure 62 : Comparaison des cinétiques de relaxation mesurées aux maxima positifs et négatifs des spectres ΔA (MbNO : 420 et 438 nm; HbNO : 416 et 432 nm).

Les ajustements avec une combinaison linéaire de 2 exponentiels (τ_{X_1} = 12 ps et τ_{X_2} = 100 ps)sont superposés. MbNO : $A(t) = 0.25 \exp(-t/12) + 0.75 [0.7 \exp(-t/100) + 0.3]$

HbNO : $A(t)=0.85 \exp(-t/12)+0.15[0.9 \exp(-t/100)+ 0.1]$

Les ajustements du type $\mathrm{erf}(\sqrt{\frac{\tau}{t}})$ sont discutés dans le texte.

L'utilisation de deux composantes de relaxation n'est pas facilement justifiable pour la myoglobine,dans l'hypothèse d'un processus de recombinaison géminée. Le recouvrement symétrique aux maxima positif et négatif de ΔA (figure 63), la distinction temporelle aisée entre état excité (à 455-470 nm) et espèce dissociée sont néanmoins en faveur d'un processus de recombinaison géminée, au lieu d'une relaxation d'état excité. Dans l'hypothèse d'une telle recombinaison, sans avoir à utiliser 2 constantes de temps τ pour l'ajustement, la solution est d'effectuer un ajustement en exp ($-\sqrt{t}/\tau_d$) ou mieux en erf ($\sqrt{\tau d}/t$)avec l'idée d'un processus de diffusion aléatoire de NO jusqu'au site catalytique. De tels ajustements doivent alors pouvoir décrire les cinétiques dans les différentes échelles de temps, avec la même valeur de τ dans le cas de MbNO(100 ps, figure 63; 400 ps figure 62).

Les ajustements de type diffusion aléatoire sont présentés figure 62 et figure 63. Ils décrivent d'une manière satisfaisante l'ensemble du processus de recombinaison. On trouve dans le cas de HbNO : τd_H=0,3 ps et pour MbNO : τd_M = 1.0 ps, en utilisant la fonction erf ($\sqrt{\tau d}/t$), c'est à dire dans le cadre d'un modèle de diffusion à une dimension. Nous avons vu que pour la diffusion de la molécule d'oxygène, ce modèle pouvait trouver sa justification dans les modèles théoriques de Case et Karplus (1979).

Avec le NO comme le ligand, si l'ajustement avec la fonction erf ($\sqrt{\ }\tau d/t$) n'est pas fortuit mais correspond à un phénomène physique, cela implique les faits suivants :

i) il existe pour NO comme pour O_2, un cheminement privilégié dans l'environnement de l'hème et en tous cas, le processus de diffusion n'est pas isotrope.

ii) la valeur différente de τd pour HbNO et MbNO révèle un processus de diffusion de NO différent dans la myoglobine et l'hémoglobine. Ceci peut être la conséquence dans HbNO d'une contribution non homogène des chaînes α et β. On peut aussi imaginer une configuration énergétique dans l'environnement de l'hème, différente dans une structure protéique tétramérique.

Les modèles théoriques de la dynamique moléculaire devraient permett de décider entre ces différentes hypothèses.

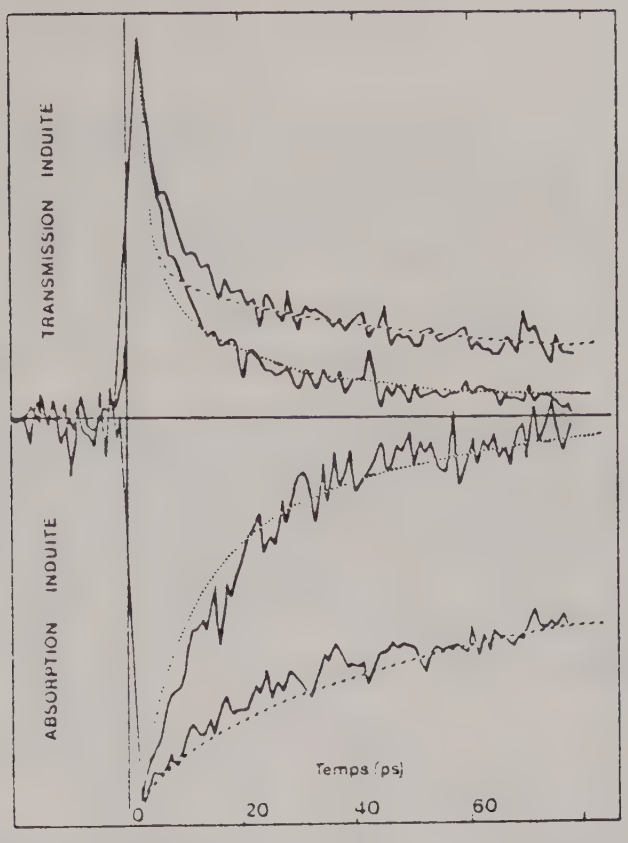


Figure 63 : Idem à figure 62, mais échelle de temps 100 ps pleine échelle.

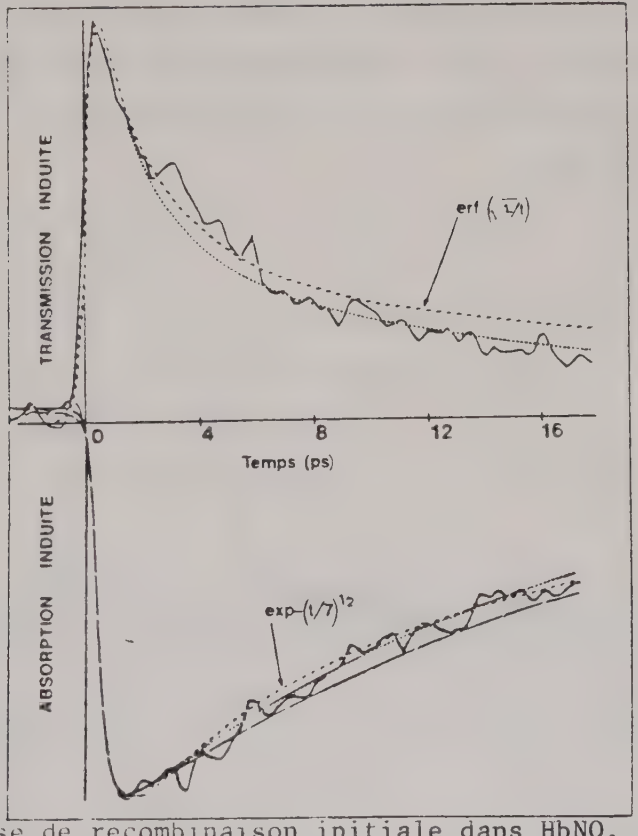


Figure 64 : Phase de recombinaison initiale dans HbNO, révélant à 416 nm la composante de relaxation et la composante τ=12 ps, et à 432 nm cette seule composante de recombinaison.

A 416 nm, on obtient ainsi un ajustement de type : 0.35 exp (-t/1.5)+ 0.65[0.9 exp (-t/12) +0.1]. La composante à 100 ps est à cette échelle approximée à une asymptote à0.1. A 432 nm on utilise l'ajustement : 0.9 exp ($-t/\tau_{X_1}$)+0.1 avec τ_{X_1} = 12 ps (.....) et τ_{X_1} =14 ps(—·—)

L'influence de facteurs stériques peut aussi être suspectée à partir des indications de la résonance nucléaire et électronique (Höhn et coll. 1983). En particulier, ces résultats indiquent un couplage entre N_{ε_2} de l'histidine distale (E7) et l'atome d'oxygène de NO, plus important pour βNO, que pour αNO. Ceci indique l'inéquivalence des chaînes dans la stabilisation de la ligandation par l'histidine distale (E 7).

L'inéquivalence dans la modulation de l'interaction Fe-N_{ε} His (F 8) lors de la dissociation de NO, peut aussi contribuer aux différences observées entre MbNO et HbNO. Il faut ainsi remarquer que le décalage usuellement observé dans la position du maximum positif de ΔA, est, dans le cas de HbNO, le plus faible observé , si l'on exclut le problème CO (+ 1 nm, figure 60). Nous avons représenté figure 65 les spectres de différences Δε de MbNO stable et à + 50 ps. On remarque la similitude des spectres avec un décalage de + 2.5 nm pour le spectre + ΔA à + 50 ps.

L'influence de la liaison Fe-N_{ε} His (F 8), sur les spectres ΔA transitoires devra être ultérieurement analysée en présence d'IHP pour pouvoir décider s'il existe une véritable relation de cause à effet et si la conformation quaternaire a un quelconque effet sur les cinétiques de recombinaison.

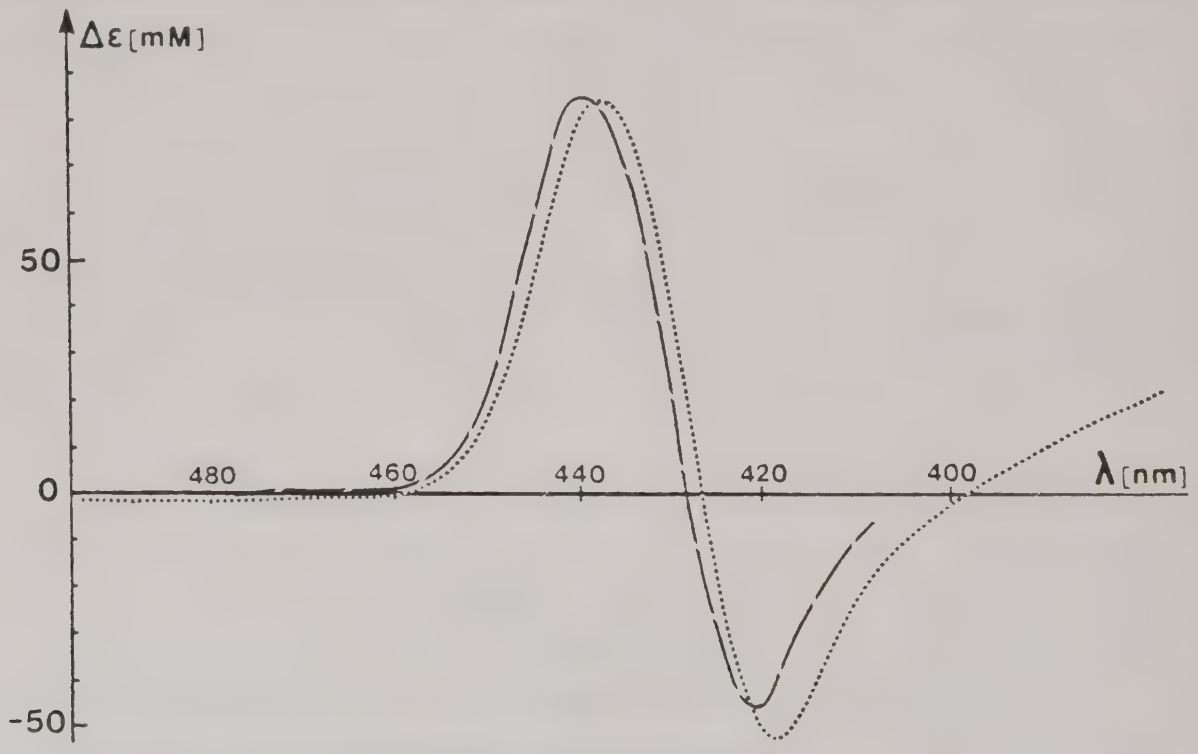


Figure 65 : spectre Δε de MbNO à l'équilibre (·····) et à + 50 ps (——) après photodissociation à 580 nm avec des impulsions de 110 Fs.

C O N C L U S I O N

Nous avons, dans ce travail, étendu au domaine femtoseconde l'analyse dynamique de l'interaction hème-ligand. Tirant parti de cette résolution associée à une possibilité d'analyse spectrale du proche ultraviolet au proche infrarouge, nous avons résolu les cinétiques d'apparition des espèces déligandées (300 Fs $\pm$ 50 ps) après photodissociation de l'oxyde de carbone, de l'oxygène et de l'oxyde azotique.

Nos résultats sont réunis tableau 10.

On constate tout d'abord qu'il n'existe pas de différences significatives dans les cinétiques d'apparition des espèces déligandées, et l'on peut retenir la valeur moyenne de 300 Fs $\pm$ 50 Fs. D'autre part, la présence d'un état dit excité vers 455-470 nm est liée à la présence du ligand $\underline{O_2}$ ou $\underline{NO}$ indépendamment de la configuration protéique.

Il est tentant de corréler cette présence d'états excités($\tau r \sim 1.2$ps avec la configuration électronique des complexes hème - NO et hème - O_2.

En effet, nous avons vu que l'unité FeO_2 est bien représentée, avec un modèle à deux configurations d'état de spin :
$Fe^{2+}(S=0), O_2(S=0)$ et $Fe^{2+}(S=1)$, $O_2(S=1)$,
configuration qu'il faut rapprocher de l'état faible spin (S=1/2) du complexe Fe-NO.

Il faut aussi envisager le rôle de la liaison hydrogène avec le N_ε de l'histidine distale. Cette liaison hydrogène existe en effet dans le cas d'une ligandation NO, comme le montre la figure 66. On remarque aussi la position de NO similaire à O_2 (configuration coudée et non linéaire comme pour CO).

Nous avons tenté, bien que cela ait un caractère spéculatif, d'attribuer le déplacement du point isosbestique et des maxima positifs de ΔA à des modifications de l'interaction Fe-N_ε His (F 8).

Espèces	τ_{app} (fs)	Présence Etat excité (450-470 nm)	τ_r (ps)	$\Delta\lambda$/stable (max ΔA) (nm)	$\Delta\lambda$/stable (isosbestique) (nm)	Φ_{+5ps}	Recombinaison géminée			
							% 900 Fs<t<300 ps	Cinétiques (ajustements) exp : τ_{X1} τ_{X2}	τ_g $\exp-\sqrt{t}/\tau_g$	τ_d $\mathrm{erf}(\sqrt{t}/\tau_d)$
HbCO	300±40	-	-	+4.5	+4.0	0.4	< 1	-	-	-
MbCO	320±35	-	-	+3.0	+2.0	0.5	< 1	-	-	-
Proto-hème-CO	380±30	-	(*) 3.5	-0.5	0.0	-	-	-	-	-
HbO_2	280±50	+++	1.0	+4.0	+3.5	0.35	70	- 300	200	
MbO_2	250±50	+++	1.4	+3.5	+3.0	0.4	81	- 110	75	
HbNO	300±50	+++	1.1	+1.0	+1.0	0.55	99.55	12 100	7	0.2
MbNO	300±50	+++	1.1	+2.5	+2.5	0.6	82	12 100	100	1

(*) Cette phase de relaxation pourrait correspondre à une recombinaison dans le protohème CO

Tableau 10

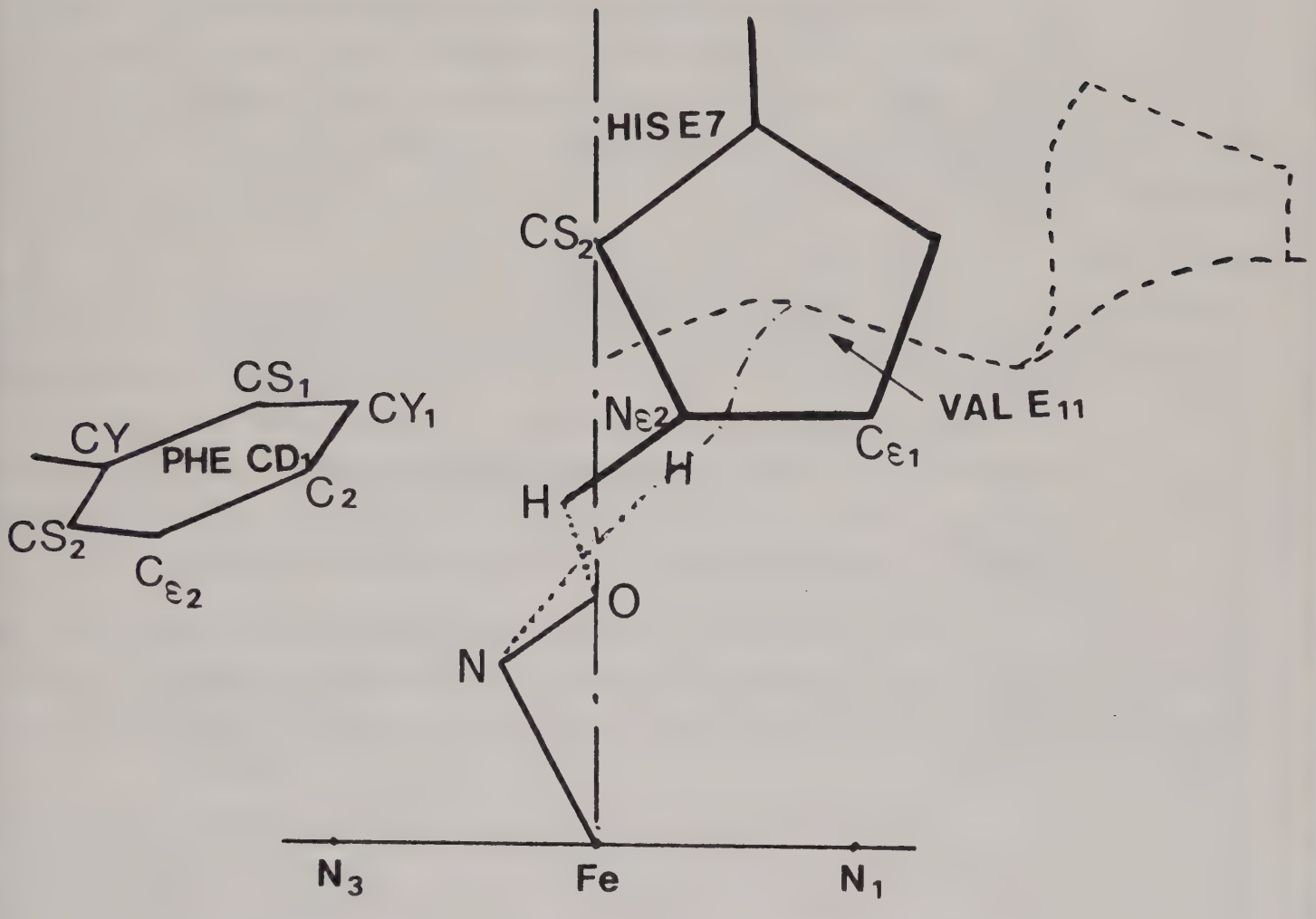


Figure 66 : Environnement de l'hème dans la nitrosylmyoglobine (·····) : ponts hydrogène (d'après Höhn et coll. 1983)

Nous n'avons pas, dans ce schéma, expliqué la valeur de $\Delta\lambda$= +1nm pour HbNO(en comparaison de + 3.5 nm pour HbO_2). La réponse pourrait provenir de la configuration électronique de l'hème complexé avec NO, qui révèle la présence dans l'orbitale antiliante dz^2(Fe), de l'électron non pairé de NO. Or, il est connu que l'occupation de cette orbitale entraîne un affaiblissement de l'interaction Fe-N_ε His (F 8).

Le calcul du rendement quantique de dissociation (Ø) à + 5 ps, c'est-à-dire le pourcentage de photons absorbés ayant conduit à une dissociation du ligand, indique une valeur d'environ 0.5, indépendamment du ligand et de la structure protéique (Mb ou Hb). Ce résultat contraste avec les valeurs de rendement quantique usuellement données dans la littérature. L'explication se trouve dans la présence (ou non) d'une phase de recombinaison géminée.

Pour les carboxyhémoprotéines, où nous n'avons pas mis en évidence de phases de relaxation ou de recombinaison, nous aurions dû trouver un rendement quantique proche de 1. Or il s'avère que 50% de l'espèce photodissociée ne se trouve pas sous forme d'une espèce de type Hb^+ ou Hb^* ou autre et ne conduit pas à une bande d'absorption dans notre domaine d'analyse. La nature de 50% de l'espèce dissociée, qui n'absorbe plus dans le domaine de la Soret et à durée de vie supérieure à 400 ps, reste donc à déterminer.

Dans le cas des oxyhémoprotéines et des nitrosylhémoprotéines, nous démontrons que les valeurs de rendement quantique faibles, quand elles sont déterminées à l'échelle de la nanoseconde ou de la microseconde, sont essentiellement la conséquence d'un processus de recombinaison géminée.

Les différentes tentatives d'ajustement sont en faveur d'une loi de recombinaison suivant un modèle de diffusion aléatoire duligand. Le cas de NO est remarquable. L'ajustement en $\exp-(\sqrt{t}/\tau g)$ donne τg(MbNO)=100 ps et τg(HbNO)=7 ps. Des travaux ultérieurs auront à déterminer la nature des phénomènes dans l'environnement de l'hème, responsables d'une telle différence dans l'accessibilité du NO au site catalytique.

ANNEXE 1

TRAITEMENT DES CINETIQUES

Comme il a été développé auparavant, la variation d'absorption induite par une impulsion d'intensité Ip(t) sur une impulsion test d'intensité It(t) avec τ, le délai entre les deux impulsions, est donnée par :

$$\Delta\alpha(\tau) = \alpha_o \int_{-\infty}^{+\infty} A(\tau-\tau') \int_{-\infty}^{+\infty} Ip(t)\, It(t+\tau')\, dt\, d\tau' \qquad (A_1)$$

Dans cette approximation $A(\tau)$ est la réponse percussionnelle de l'absorption moléculaire. Dans le cas d'une réponse instantanée, $A(\tau)$ est constant et la réponse est alors donnée par la corrélation des deux impulsions.

Si on introduit à la fois une réponse retardée de temps de réponse τ_1 et une relaxation du phénomène suivant une certaine loi de relaxation normalisée, c'est à dire R(t) décroissant de 1 à 0 pour τ variant de 0 à + ∞, on trouve :

$$A(t) = [1-\exp(-t/\tau_1)]\,[1-q+qR(t)] \qquad (A_2)$$

où q est le pourcentage de relaxation du phénomène (q entre 0 et 1).

Le traitement des données utilise l'équation (A_1) intégrée numériquement (FORTRAN IV - HP 1000). Différentes formes d'impulsions peuvent être utilisées suivant les conditions expérimentales, avec τp le paramètre durée :

1. Monoexponentielle $\quad I(t) = \exp[-\ln 2\, t/\tau p\,] \quad t > 0$

2. Biexponentielle $\quad I(t) = \exp[-2\ln 2\, |\frac{t}{\tau p}|]$

3. Sécante hyperbolique^2 $\quad I(t) = \mathrm{sech}^2\{1.76\, \frac{t}{\tau p}\}$

4. Gaussienne $\quad I(t) = \exp-(4\ln \frac{t^2}{\tau p^2})$

De même, différentes lois de relaxation peuvent être introduites :

1. Loi exponentielle $\quad R(t) = \exp - t/\tau_X$

2. Loi de diffusion $\quad R(t) = \exp - (t/\tau_g)^{1/2}$

3. Loi de diffusion linéaire $\quad R(t) = \mathrm{erf}\,(\sqrt{\frac{\tau d}{t}}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_o^{\sqrt{\frac{\tau d}{t}}} \exp-u^2\, du$

Pour tenir compte de la contribution à une longueur d'onde donnée, de plusieurs phénomènes à évolution indépendante, le traitement informatique autorise des combinaisons linéaires du type :

$a_1 \ \Delta\alpha_1 \ (\tau) + a_2 \ \Delta\alpha_2 \ (\tau) + \ldots$

La méthode d'ajustement consiste à analyser des cinétiques à des longueurs d'onde où une seule espèce absorbe, c'est-à-dire où les spectres d'absorption transitoires ne se recouvrent pas. Les combinaisons linéaires appropriées sont alors effectuées dans les zones de recouvrement.

BIBLIOGRAPHIE

-Alben,J.O.,Beece,D., Bowne,S.F.,Doster,W., Eisenstein,L., Fravenfelder,H., Good,D., Mc Donald,J.D., Marden,M.C., Moh,P.P., Reinisch,L., Reynolds,A.H., Shyamsunder, E. et Yue, K.T.(1982).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3744-3748.

-Alberding, N., Austin, R.H., Chan, S.S., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Gunsalus, I.C. et Nordlund, T.M. (1976)
J. Chem. Phys. 65 , 4701-4711

-Alberding, N., Chan, S.S., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, D., Gunsalus, I.C., Nordlund, T.M., Perütz, M.F., Reynolds, A.H. et Sorensen, L.B. (1978).
Biochemistry 17, 43-51.

-Alpert,B., Banerjee, R. et Lindqvist, L.(1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 558-562

-Antonetti,A., Chambaret,J.P., Hamoniaux, G., Migus,A.et Orszag, A.(1978)
C.R. Hebd. Seances Acad. Sci, sér. B., 286,143-146.

-Antonini,E., et Brunori,M. (1971)
Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands (Eds : Neuberger,A., et Tatum, E.L)
North Holland Pub. Co, Amsterdam, London.

-Austin, R.H., Breeson, K.W., Eisenstein,L., Frauenfelder, H. et Gunsalus,I.C (1975)
Biochemistry 24, 5355-5373.

- Baldwin, J.M., (1980)
J. Mol. Biol. 136, 103-128

- Baldwin, J.M. et Chothia, C., (1979)
J. Mol. Biol. 129, 175-220

-Banerjee, R., Stetzkowski, F et Henry, Y (1973)
J.Mol. Biol. 73, 455-467.

-Barlow, C.H., Maxwell, J.C., Wallace, W.J. et Caughey, W.S. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 91-95.

-Bloembergen, N., (1973)
Opt. Commun. 8, 825

- Bücher, T., et Negelein, E.,(1942)
Biochem,Z., 311, 163-187.

-Bücher,T., et Karpers, J., (1947)
Biochem. Biophys. Acta 1 , 21-34

-Case, D.A., et Karplus,M., (1977)
J.Am. Chem.Soc., 99, 6182-6195

- Case, D.A., Karplus, M., (1978)
J.Mol. Biol. 123, 697-701.

-Case,D.A., et Karplus,M. (1979)
J. Mol. Biol. 132, 343-368

-Case, D.A., Huynh, B.H. et Karplus, M., (1979)
J. Am. Chem. Soc. 101, 4433-4453.

-Cerdonio,M., Congiu-Castellano,A., Mogno,F., Pispisa, B., Romani,G.L. et Vitale, S.(1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 74, 398-400.

-Chien, J.C.W.,(1969)
J. Amer. Chem. Soc. 91, 2166-2168.

-Chernoff,D.A., Hochstrasser,R.M.. et Steele, A.W.(1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5606-5610.

-Collman, J.P., Brauman,J.I.,Halbert,T.R.et Suslick, K.S. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3333-3337.

-Cornelius,P.A., Steele, A.W., Chernoff,D.A. et Hochstrasser, R.M.(1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7526-7529.

-Cornelius, P.A., et Hochstrasser, R.M., (1982)
Picosecond Phenomena III(Eisenthal,K.B., Hochstrasser, R.M., Kaiser,W., et Laubereau,A., eds).
Springer Verlag, Berlin.

-Cornelius,P.A., Hochstrasser, R.M., et Steele,A.W.,(1983)
J. Mol. Biol. 163, 119-128.

-Dalvit,C., Cerdonio,M.,Fontana,A.,Mariotto,G., Vitale,S., de Young,A., et Noble,W.,(1982)
FEBS Letters 140, 303-306.

-De Maria,A.J., Stetser,D.A. et Heynau, H. (1966)
Appl. Phys. Lett. 8, 174.

-Desbois, A., et Lutz, M., (1981 a)
Biochim. Biophys. Acta 671, 168-176.

-Desbois, A., Lutz,M. et Barnejee,R., (1981 b)
Biochim. Biophys. Acta 671, 177-183.

-Desbois,A., Lutz, M., et Banerjee,R.,(1981 c)
Biochim. Biophys. Acta 671, 184-192

-Dickinson,L.C. et Chien, J.C.W.(1973)
J. Biol. Chem 248, 5005

-Doster,W., Beece,D., Bowne, S.F., Di Iorio,E.E., Eisenstein,L.,Frauenfelder, H., Reinisch,L., Shyamsunder, E., Winterhalter,K.H. et Yue,K.T (1982),
Biochemistry 21, 4831-4839.

-Duddell,D.A., Morris,R.J. et Richards,J.T.(1979).
J.C.S. Chem. Commun. pp. 75-76.

-Duddell,D.A., Morris,R.J. et Richards, J.T.(1980)
Biochim. Biophys. Acta 621, 1-8.

-Duff,L.L., Appelman, E.H., Shriver, D.F., Klotz, I.M. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 90, 1098-1103.

-Eaton, W.A., Hanson, L.K., Stephens, P.J., Sutherland,J.C. et Dunn, J.B.R (1978)
J. Am. Chem.Soc. 100, 4991-5003.

-Eisenberger, P., Shulman, R.G., Brown,G.S. et Ogawa, S.(1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 491-495.

-Eisenberger, P., Shulman, R.G., Kincaid, B.M., Brown, G.S. et Ogawa,S.(1978)
Nature London 274, 30-34

-Eisert, W.G., Degenkolb,E.O., Noe,L.J. et Rentzepis, P.M.(1979)
Biophys. J. 25, 455-464.

-Fermi, G.(1975)
J. Mol. Biol. 97, 237-246.

-Fermi, G.(1977)
J. Mol. Biol. 114, 412-413

-Frauenfelder,H.(1978)
"Biomembranes, Part E, Biological oxidations, Specialized Techniques"(S. Fleischer et L. Packer, eds.),
Methods in Enzymology, vol.54, pp. 506-532, Academic Press, New-York.

-Friedman, J.M. et Lyons, K.B.(1980)
Nature(London) 284, 570-572.

-Gelin, B.R. et Karplus, M.(1977)
Proc. Natl. Acad.Sci. USA 74, 801-805

-Gibson, Q.H. et Ainsworth, S.(1957)
Nature 180, 1416-1417.

-Gibson, Q.H. et Antonini, W.(1967)
J. Biol. Chem. 242, 4678-4681.

-Greene, B.I., Hochstrasser, R.M., Weisman, R.B. et Eaton, W.A. (19878)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5255-5259.

-Haldane, J. et Lorraine-Smith, J.(1896)
J. Physiol. London 20, 497-520.

-Hanson, J.C. et Schoenborn, B.P.(1981)
J. Mol. Biol. 153, 117-146.

-Haus, H.A., Shank, C.V. et Ippen, E.P.(1975)
Opt. Comm. 15, 29-31.

-Henry. Y. et Banerjee, R. (1973)
J. Mol. Biol. 73, 469-482.

-Hilinski, E.F. et Rentzepis, P.M. (1983)
Nature, London 302, 481-487.

-Hoard, J.L. (1971)
Science 174, 1295

-Hoard, J.L.(1975)
"Porphyrins and Metalloporphyrins "
K. Smith, Ed., Elsevier.

-Höhn,M., Hüttermann, J., Chien, J.C.W., Dickinson, L.C.(1983)
J. Am. Chem. Soc. 1983. 105, 109-115.

-Hutchinson, J.A., Traylor,T.G. et Noe, L.J.(1982)
J. Am. Chem. Soc. 104, 3221-3223.

-Ichiye, T. et Karplus, M.(1983)
à paraître.

-Ippen, E.P. et Shank, C.V.(1975)
Appl. Phys. Lett. 27, 488.

-Jameson, G.B., Molinaro, F.S., Ibers, J.A., Collman, J.P., Brauman, J.I., Rose,E. et Suslick, K.S.(1978)
J. Am. Chem. Soc. 100, 6769-6770.

-Jameson, G.B., Molinaro, F.S., Ibers, J.A., Collman, J.P., Brauman,J.I., Rose, E. et Suslick, K.S.(1980).
J.Am. Chem. Soc. 102 , 3224-3227.

-Karger, W.(1962)
Z. Naturforsch. B 17, 137

-Karplus, M. et Mc.Cammon, J.A.(1981)
CRC, Crit. Rev. Biochem. 9, 293.

-Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies,D.R., Phillips, D.C. et Shore, V.C. (1960)
Nature (London) 185, 422-427

-Kendrew, J.C.(1963)
Science 139, 1259-1266

-Kirchner, R.F. et Loew, G.H.,(1977)
J. Am. Chem. Soc. 99, 4639-4647.

-Kitagawa, T., Ondrias, M.R., Rousseau, D.L., Ikeda-Saiko, M. et Yonetani, T (1982)
Nature, London 298, 869-871.

-Koenig, D.F., (1965)
Acta. Cryst1 . 18, 663-673

-Koster, A.S.(1975)
J. Chem. Phys. 63, 3284-3286.

-Levine, B.F., Shank,C.V., Heritage, J.P. (1979)
IEEE J. Quantum Electron. Appl. QE I5 , 1418.

-Lindqvist, L., El Mohsni,S., Tfibel, F. et Alpert, B.(1980)
Nature, London 288, 729-730.

-Lindqvist, L., El Moshni, S., Tfibel, F., Alpert,B. et André J.C.(1981)
Chem.Phys. Lett. 79, 525-528.

-Makinen, M.W., Churg, A.K. et Glick, H.A. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2291-2295.

-Maling , J. et Weissbluth,M. (1964)
Electron Aspects of Biochemistry, B. Pullman, editor (Academic New-York) 93

-Martin, J.L., Astier, R., Antonetti, A., Minard,C.A et Orszag, A., (1979)
C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci. Sér. B. 289, 45-87.

-Martin, J.L., Antonetti, A., Astier, R., Etchepare, J., Grillon, G. et Migus, A.(1980 a)
SPIE Proceedings, 211, 128-132.

- Martin, J.L., Astier, R., Migus, A. et Antonetti, A. (1980 b)
Lasers in Photomedecine and Photobiology
Pratesi,R. et Sacehi, C.A., eds, Springer-Verlag, Berlin

-Martin, J.L., Migus, A, Poyart, C., Lecarpentier, Y., Antonetti, A. et Orszag, A (1982)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 107, 803-810.

-Martin, J.L., Migus,A., Poyart, C., Lecarpentier, Y., Astier, R.et Antonetti,A (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 173-177.

-Maxwell, J.C., Volpe, J.A., Barlow, C.H. et Caughey, W.S.(1974)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 166-171.

-Migus, A., Martin, J.L., Astier, R. et Orszag, A.(1980)
Picosecond Phenomena II, Hoch strasser, R.M., Kaiser, W.et Shank, C.V, eds, Springer-Verlag, Berlin.

-Migus, A., Shank, C.V., Ippen, E.P. and Fork, R.(1982)
IEEE, J. Quantum Electron. QE 18, 101-109.

-Monod, J., Wyman, J. et Changeux, J.P.(1965)
J. Mol. Biol. 12, 88-118.

-Nagai, K., Hori, H., Toshida, S., Sakamoto, H. et Morimoto, H.(1978)
Biochem. Biophys. Acta. 532, 17.

-Nagai,K. et Kitagawa, T. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2033-2037.

-Nagumo, M., Nicol, M., El-Sayed, A.(1981)
J. Phys.Chem. 85, 2435-2438.

-Noe, L.J., Eisert, W.G. et Rentzepis, P.M.(1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 573-577.

-Norwell, J.C., Nunes, A.D. et Schoenborn, B.P. (1975)
Science 190, 568-569.

-Ondrias, M.R., Rousseau, D.L. et Simon, S.R.(1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1511-1514.

-Pauling,L.(1964)
Nature 203, 182-183.

-Penzkofer, A., Laubereau, A. et Kaiser, W.(1973)
Phys. Rev. Lett. 14, 863.

-Perutz,M.F.(1963)
Science 140, 863-869

-Perutz,M.F. et Matthews, F.S.(1966)
J. Mol. Biol. 21, 199-202

-Perutz,M.F.(1968)
Proc. R. Soc. London, Ser. B. 173, 113-140

-Perutz,M.F.(1970)
Nature,London 228, 726-739.

-Perutz,M.F.(1972)
Nature 237,495-499

-Perutz,M.F., Sanders, J.K.M., Chenery, D.M., Noble, R.W, Pennelly, R.R., Fung, L.W.-M., Ho,C., Giannini,I, Pörschke, D., Winkler,H.(1978) Biochemistry 17, 3640-3652.

-Perutz,M.F.(1979) Annu. Rev. Biochem. 48, 327-386.

-Perutz, M.F., Samar Hasnain,S., Duke, P.J., Sessler,J.L. et Han, J.E.(1982) Nature London 295, 535-538.

-Perutz,R. (1983) Communication personnelle.

-Phillips, S.E.V(1978) Nature, London 273, 247-248.

-Phillips, S.E.V.(1980) J.Mol. Biol.142, 531-554.

-Phillips,S.E.V et Schoenborn, BP.(1981) Nature, 292, 81-82.

-Pople, J.A. et Segal,G.A.(1965) J. Chem. Phys. 43, S136-S151.

-Reynolds, A.H., Rand. S.D. et Rentzepis, P.M.(1981) Proc. Natl.Acad. Sci. USA 78, 2292-2296.

-Reynolds,A.H. et Rentzepis,P.M.(1982) Biophys. 5. 38, 15-18.

-Rothgeb, T.M. et Gurd, F.R.N(1978) Methods in Enzymol 52, 473-482.

-Sala,K., Kenney-Wallace, G.A. et Hall, G.E. (1980) IEEE J. Quantum Electron. QE 16, 990-996.

-Saffran, W.A. et Gibson, Q.H.(1977) J. Biol. Chem. 252, 7955-7958.

-Sawicki,C.A. et Gibson,Q.H.(1976)
J. Biol. Chem. 251, 1533-1542.

-Sawicki, C.A. et Gibson,G.H. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 4058-4062.

-Schoenborn,B.P.(1969)
Nature London 224, 143-146.

-Schoenborn, B.P.(1971)
Cold Spring Harbor
Symp. Quant. Biol. 36, 559-575

-Shaanan,B.,(1982)
Nature, London 296, 683-684.

-Shank, C.V., Ippen, E.P. et Bershon,R.(1976)
Science 193, 50-51.

-Shank, C.V. et Ippen, E.P.(1978)
Picosecond Phenomena vol. I, C.V. Shank, E.P. Ippen et S.L. Shapiro,
Ed: Springer, New York.

-Stetzkowski, F.(1983)
Thèse de Doctorat ès-Sciences, PARIS VII.

-Swaminathan, S., Ichiye, T., Van Gunsteren, W. et Karplus, M(1982)
Biochemistry, 21, 5230-5241.

-Szabo, A. et Perutz, M.F.(1976)
Biochemistry 15, 4427-4428.

-Takano, T.(1977 a)
J. Mol. Biol. 110, 537-568.

-Takano, T(1977 b)
J. Mol. Biol. 110 , 569-584.

-Terner,J., Spiro, T.G., Nagumo, M., Nicol, M.F. et El Sayed, M.A. (1980)
J. Am. Chem. Soc. 102, 3238-3239.

-Terner,J., Stong, J.D., Spiro,T.G., Nagumo, M., Nicol, M.F. et El Sayed,M.A. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 1313-1317.

-Terner,J., Voss, D.F., Paddock, C., Miles, R.B. et Spiro, T.G.(1982)
J. Phys. Chem. 86, 859-861

-Topp, M.R., Rentzepis, P.M. et Jones, R.P.(1971)
Chem. Phys. Lett. 9, 1.

-Wang, C-M et Brinigar, W.S. (1979)
Biochemistry 18, 4960-4977.

-Watson, H.C (1969)
Prog. Stereochem. 4, 299-333

-Weiss, J.J. (1964)
Nature 202, 83-84.

-Weissbluth, M.(1967)
Struc. Bonding (Berlin) 2, 1-12.

-Wittenberg, J.B.(1970)
Physiol. Rev. 50, 559-636.

-Zerner, M. et Gouterman, M.(1966)
Theor. Chim. Acta 4, 44-63.

-Waleh, A. et Loew, G.H. (1982)
a) J. Am. Chem. Soc. 104, 2346-2351
b) J. Am. Chem. Soc. 104, 2352-2356

ANNEXE 2

PUBLICATIONS

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 80, pp. 173–177, January 1983
Biophysics

Femtosecond photolysis of CO-ligated protoheme and hemoproteins: Appearance of deoxy species with a 350-fsec time constant

(femtosecond spectroscopy/CO-heme photolysis kinetics/excited states of hemoglobin, myoglobin, and protoheme/molecular dynamics)

J. L. MARTIN*, A. MIGUS*, C. POYART†, Y. LECARPENTIER*, R. ASTIER*, AND A. ANTONETTI*

*Laboratoire d'Optique Appliquee, Ecole Polytechnique–Ecole Nationale Supérieure de Techniques Avancées, 91120 Palaiseau, France; and †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U27, 92150 Suresnes, France

Communicated by Martin Karplus, September 30, 1982

ABSTRACT **Photolysis of HbCO, MbCO, and CO-protoheme has been investigated by measuring transient differential spectra and kinetics of induced absorption after excitation with a 250-fsec laser pulse at 307 nm. Probing was performed by a part of a continuum pulse between 395 and 445 nm. Photodissociation of the three liganded species occurred within the pulse duration. By contrast, the formation of deoxy species appeared with a mean (± SD) response time of 350 ± 50 fsec. This time constant was identical for the three species and independent of the presence or absence of the protein structure. Our results suggest the formation of a transient high-spin in plane iron (II) species which relaxes in 350 fsec to a high-spin stable state with concerted kinetics of CO departure and iron displacement. The spin transition is suspected to occur via liganded excited states which relax in part to nonreactive states with a 3.2-psec time constant.**

Picosecond spectroscopy has revealed that the dissociation of ligand from the heme in Mb and Hb occurs within 4 psec and that the nonliganded species (Mb or Hb) were formed with a time constant of 11 psec (1, 2). This has been confirmed recently by Cornelius *et al.* (3) who observed the appearance of Mb species after photodissociation of MbO_2 with a 12-psec time constant; their results on MbCO showed a "simultaneous development of both bleaching and absorption intensities." From results of studies with 0.5-psec optical pulses at 615 nm in a pump probe experiment, Shank *et al.* (4) deduced that the photolysis of CO from HbCO should occur in less than 0.5 psec.

More recently, Greene *et al.* (5) and Chernoff *et al.* (6), using 8-psec excitation pulses at 353 and 530 nm, obtained transient absorption spectra in the Soret and visible regions at 10 and 680 psec which indicated that deoxy species formed in a time shorter than their pulse duration. Terner *et al.* (7) used picosecond resonance Raman methods and found formation of HbCO photoproducts with spectra similar to those of deoxy Hb and corresponding to a high-spin at least partially out-of-plane Fe(II) state. These events occurred within 30 psec, their pulse duration.

Up to now, the kinetics of photodissociation of ligand from heme in hemoproteins has not been precisely resolved. Recent theoretical approaches dealing with the energies involved in ligand reactions to and from the heme and their relationship with the protein matrix surrounding the heme (8, 9) have led to tentative models describing the probable pathway(s) through energy barriers of the ligand in the heme pocket. It is of primary importance for such theoretical approaches to be supported by accurate quantitative measurements of the very early steps of the chemical events leading to the formation or dissociation of the ligand–heme complex.

In the present work, we have limited ourselves to the investigation of the kinetics of formation of the nonliganded species after dissociation of CO from MbCO and HbCO. In order to appreciate the possible influence of polypeptidic environment on the heme reactivity in these hemoproteins, we have also studied the kinetics of CO dissociation from protoheme and of deoxyprotoheme formation. These experiments were carried out with a newly developed spectroscopic technique operating with laser pulses of 250 fsec duration to excite the hemes at 307 nm.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of the Hemoproteins and Protoheme Solutions. Purified human adult hemoglobin was prepared from fresh human blood by DEAE-Sephadex chromatography (10). The experimental solution was 0.1 mM on the basis of heme; it was diluted in 0.1 M K phosphate buffer at pH 7 or 8. The solution was first deoxygenated under moist argon before equilibration with CO at 1 atm (1 atm = 1.013×10^5 pascals). MetMb (horse heart type III, Sigma) was converted to $MbFe^{2+}$ after addition of a 5 molar excess of freshly prepared Na dithionite (Merck) under strict anaerobic conditions and then equilibrated with pure CO. This stock solution was chromatographed on an ion exchange resin column to remove dithionite and then diluted to 0.1 mM heme in the same buffer as HbCO. The purity of HbCO and MbCO was checked by isoelectric focusing which revealed a single band for both proteins. Protoheme was prepared from hemin [Fe^{3+}(protoporph)Cl] (bovine type I, Sigma) as follows. A stock solution (2 mM) was prepared in 1 M NaOH solution and then diluted in polyethylene glycol (PEG, Merck) to a final concentration of 0.1 mM. A 5 molar excess of Na dithionite was added under anaerobic conditions and a deoxy Hb spectrum (Cary 219, Varian) was recorded.

The deoxy solution was equilibrated with CO and kept in ice water until used. We observed that the deoxy spectrum of protoheme was much dependent upon the PEG/NaOH ratio (vol/vol), the highest value of $\epsilon_{420.5} = 138.6\ mM^{-1}cm^{-1}$ being obtained with a ratio of 94:6 or more. Changes in absorbance of deoxy protoheme solution and, to a lesser extent, of fully liganded protoheme with the nature of the solvent have been attributed to aggregation of the protoporphyrin molecules in aqueous media (11). In the CO-protoheme solutions ($\epsilon_{411} = 207.3\ mM^{-1}cm^{-1}$), the Na dithionite was not removed before the experiment because of the rapid oxidation of the iron complex during the ion exchange chromatography (12). However, at the concentration used in this study, the absorbance of the protoheme samples at 307 nm was not very different from that recorded in the MbCO or HbCO samples.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U. S. C. §1734 solely to indicate this fact.

Aliquots of the stock solutions of carboxylated protoheme, MbCO, or HbCO were transferred anaerobically into a 1-mm recirculating quartz cuvette (both openings sealed with rubber bungs) filled with CO (Hellma, France). Optical spectra of the solutions were recorded both before and at the end of each experiment. It was regularly observed that the two spectra were identical, indicating no alteration of the solutions during the run. This was obtained by moving the horizontal cuvette perpendicularly to the beam at a linear speed of 12 mm/sec, so that each pulse at 10 Hz excited a new region of the sample. All experiments were performed at room temperature.

Time-Resolved Spectrophotometric Method. For the initial laser source we built a passive-mode locked CW dye laser (13). The rhodamine 6G gain stream is located near the center of the resonator and is optically pumped by 4–5 W of a CW argon ion laser at 5145 Å. The second stream near one end of the resonator contains a mixture of two saturable absorbers, 3,3′-diethyloxadicarbocyanine iodide and malachite green. The duration of the pulse (0.7 psec) and the simultaneously measured frequency spectrum (about 20 Å) indicate excess bandwidth due to dispersion in the cavity. Direct compression is then achieved by using a grating pair technique (14): two gratings of inverse constant, 1,200 lines/mm, with a separation of 90 cm are effectively used in first-order reflection at $\lambda = 614$ nm at an angle of incidence of 45°. Undesirable energy in the pulse wings is eliminated by removing the yellow part of the spectrum by using an aperture in the light path between the two gratings.

The resulting pulses of duration <0.3 psec are close to being transform-limited and have an energy of the order of 1 nJ. For time-resolved spectroscopy, we amplify these pulses to higher power to generate new wavelengths covering a large spectrum range. Amplifying these pulses to powers in the gigawatt range requires special considerations to avoid temporal broadening. The specific amplifier configuration used in our experiment has three stages pumped by a Q-switched frequency doubled Nd-YAG laser generating pulses of 14 nsec in duration, 500 mJ energy at 530 nm for a 10-Hz repetition rate (15). This setup produces final pulses with a peak intensity up to 3 GW while maintaining a pulsewidth of 0.25–0.30 psec.

The pulse train is then split into two parts. After passing through a variable delay line driven by a stepping motor, one beam is focused into a 0.75-mm-thick (potassium dihydrogen phosphate) crystal to generate pulses at 307 nm. This thin crystal ensures phase-matching of the whole pulse bandwidth without pulse broadening but gives a low efficiency for the second harmonic conversion—i.e., 10 μJ at 307 nm. The UV beam is focused on a 300-μm-diameter spot in the sample and initiates the photodissociation of the sample. The other half of the 614-nm beam is focused into a 2-cm cell filled with water and generates a white light continuum. The blue part of the spectrum is selected with colored filters and split into two beams: one beam probes collinearly the excited part of the sample and the other (reference beam) misses the cuvette. These two continuum beams are then focused on the 400-μm entrance slit of a 0.25-m spectrograph used in the first-order of a 600-groove-per-mm grating (ensuring, with a 400-μm output slit, a spectral resolution of 20 Å) and directed to two diodes. The two signals, corresponding to the probe and reference pulses energy at a given wavelength, are sent through an electronic chain (pulse shaping, sampling holder, and digitizer) to a computer; their ratio is determined and used in a multichannel analyzer program. Shots for which energy varied more than 50% from the mean were rejected. In one sweep, corresponding to 10 psec, 100 positions of the delay line were examined and 5 of these ratios were integrated for each position. Typically, 40 sweeps have been realized to get a good signal-to-noise ratio.

For each sample, we analyzed the signal rise time at two different wavelengths: the first one corresponded to the peak of the CO liganded species and the second corresponded to the peak of the deoxy species.

The absorption change induced by a pulse of intensity $I_p(t)$ on a test pulse of intensity $I_t(t)$ with τ as the delay between the two pulses is given by (16):

$$\Delta\alpha(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} A(\tau - \tau') \int_{-\infty}^{+\infty} I_p(t)\, I_t(t + \tau')\, dt\, d\tau'.$$

In this expression, $A(\tau)$ is the impulse response of the molecular absorption. In case of instantaneous response, $A(\tau)$ is a constant and the medium response is then determined by the integral of the pulse's correlation function. From other experiments (17) we know that the shape of our pulses is close to one-sided exponential with Δt, the full width at half maximum, of the order of 250 fsec.

In this case, all the curve rise times corresponding to the disappearance of the liganded species are proportional to the integral of the pulse's correlation function with $\Delta t = 250$ fsec. These best fits have been realized by using the expression:

$$I/I_0(\tau) = \exp[-\Delta\alpha(\tau)\, l]$$

in which l is the medium length, and I/I_0 is the probe-pulse measured transmission at delay τ between pump and probe.

The appearance of the deoxy species could not be fitted with an instantaneous response but were well fitted with the response function

$$A(t) \approx 1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_X}\right),\ t \geqq 0$$

in which τ_X is the response time of the molecular species X.

An important point is to estimate the influence of group velocity dispersion. A time-broadening factor occurs when the UV and the blue pulses overlap inside the sample length but travel with different group velocities.

We have computed this broadening to be of the order of 90 fsec, but we must point out that this slowing down of the response is almost the same from 400 nm to 435 nm and then is taken into account in the instantaneous response best fit and has no effect in the determination of the appearance of the deoxy species time constants. We must also consider the group velocity dispersion in the continuum pulse. The dispersion between two different wavelengths may be estimated by summing the differences in the propagation time through the different dispersive media between the continuum generation and the sample (water, lens, beam splitter, and filters). We have computed the difference to be $\delta\tau_c/\Delta\lambda = 40$ fsec/nm. This will appear in two ways: (*i*) a broadening of 60 fsec into the spectral width of the observed continuum pulse, as previously taken into account in the instantaneous response, and (*ii*) a pure delay of the time coincidence between pump and probe when the probe wavelength is shifted from the liganded spectrum maximum to the deliganded spectrum maximum. The typical shift (15 nm) induced an observed delay at 600 fsec, which is in good agreement with our estimation.

RESULTS

Photolysis of HbCO Solutions. Fig. 1*A* shows the change in transmission at 419 nm, a wavelength at which bleaching in HbCO is maximal as recorded from transient picosecond differential spectra. These kinetics were found to be limited by the pulse duration. By contrast the rate of induced absorption at 434 nm, the maximal positive peak of the transient ΔA spectrum,

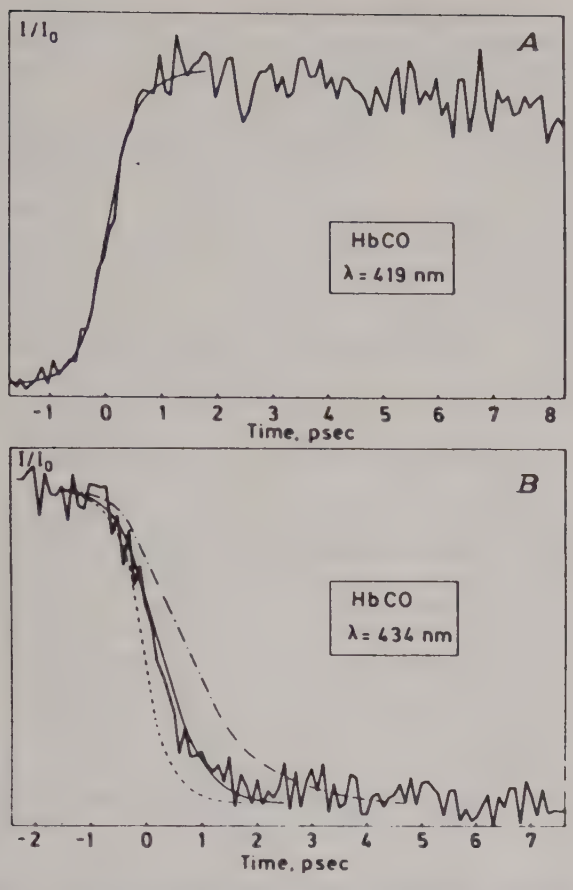


FIG. 1. Normalized kinetic data for HbCO excited at 307 nm with 250-fsec pulses, covering delays from −2 to +8 psec. (*A*) Induced transmission (I/I_0) at the absorbance maximum of HbCO (λ = 419 nm) showing a rise time limited by the pulse duration. The heavy line is the experimental record. The thin line represents the instantaneous response best fit computed as explained in the text. (*B*) Induced absorption at the maximal positive change of the difference spectrum corresponding to the formation of deoxy Hb (λ = 434 nm). Heavy line is the experimental record. The thin continuous line is the best fit corresponding to a time constant τ_{Hb} = 300 fsec (see text). ----, Computed instantaneous response; –·–, simulated solution with a time constant of 1 psec.

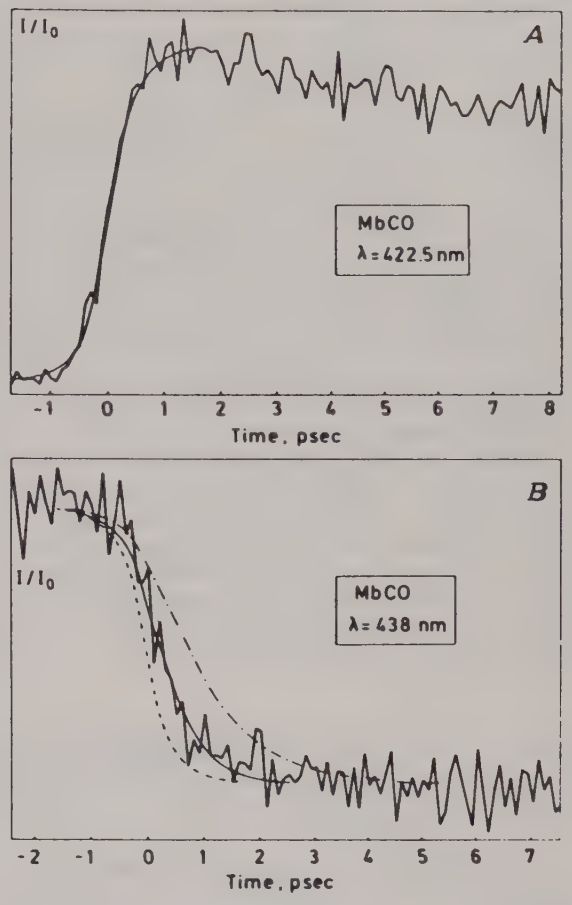


FIG. 2. Normalized kinetic data for MbCO excited at 307 nm in the same conditions as for HbCO. Symbols and lines as in Fig. 1. (*A*) Maximum induced transmission (λ = 422.5 nm). (*B*) Maximum induced absorption (λ = 438 nm). In *B* the thin line is the best fit corresponding to τ_{Mb} = 320 fsec.

cannot be fitted to an instantaneous response (Fig. 1*B*). The best fit of the rate of appearance of deoxy Hb is obtained for τ_{Hb} = 300 ± 40 fsec (mean ± SD). It has been determined that τ_{Hb} is independent of pH (7–8), of ionic strength (0.01–0.1 M), and of CO concentration (0.01–1 atm).

Photolysis of MbCO. Similar experiments were carried out in MbCO solutions with interrogating wavelengths of 422.5 nm for bleaching and 438 nm for induced absorbance changes, the two negative and positive maxima of the transient ΔA spectrum. It is remarkable that, as for HbCO, the rate of bleaching (Fig. 2*A*) is instantaneous ($<<\Delta t$) whereas the rate of appearance at deoxy Mb was observed at τ_{Mb} = 320 ± 35 fsec (best fit in Fig. 2*B*).

The identity of these results in HbCO and MbCO solutions prompted us to analyze protoheme solutions.

Photolysis of CO-Protoheme Solutions. As evident from Fig. 3 the rates for bleaching and for the appearance of deoxy protoheme at 410 and 420 nm, the negative and positive maxima of the transient ΔA spectrum, were similar to those observed in HbCO and MbCO solutions—i.e., instantaneous bleaching at 420 nm and τ_H = 380 ± 30 fsec, respectively.

Fig. 3*A* shows that a relaxation of the bleaching at 410 nm occurs, with a time constant of 3.2 psec (best fit of the exponential decay). Such a relaxation of the signal of the carboxylated species (not seen in deoxy species) was also observed in HbCO and MbCO (Figs. 1*A* and 2*A*) with a similar time constant (3.2 psec). However, the importance of the relaxation varies considerably between the protoheme solution (≅50% decay after 20 psec) and either HbCO or MbCO solution (10% and 20% decay after 20 psec). No further decay was observed up to 100 psec. Full development of the interpretation of this relaxation will be given elsewhere.

DISCUSSION

Kinetics. Dynamics of photodissociation of ligands from heme proteins are well documented in studies using picosecond laser techniques (1–7). The best time resolution associated with an accurate optical spectrum of the initial photolysis product has been achieved by Greene *et al.* (5), Chernoff *et al.* (6), and, more recently, by Cornelius *et al.* (3). They observed the formation of a deoxy-like Hb species 6 psec after 530-nm excitation. Their deliganded species appeared within their pulse duration, corresponding to the depletion of the HbCO population within the same time. Reynolds *et al.* (2) found that the formation of deoxy Mb was initiated in 15 psec both for MbCO and MbO_2 whereas the disappearance of the liganded species occurred in 5 psec. Terner *et al.* (7) used picosecond resonance Raman spectroscopy and found the presence of deoxy Hb in less than 30 psec after HbCO photolysis.

In the present study, we determined that the photodissocia-

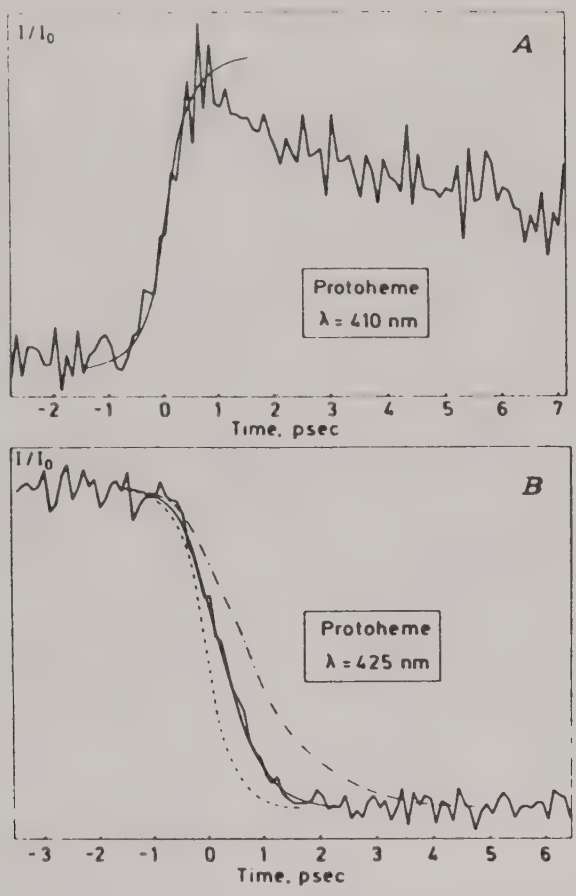


FIG. 3. Normalized kinetic data for CO-protoheme in 94% polyethylene glycol solution excited at 307 nm. (*A*) Induced transmission at the absorbance maximum of CO-protoheme (λ = 410 nm). The thin line indicates the instantaneous response. Note the well-defined relaxation of the signal whose time constant is 3.2 psec (best fit) and which corresponds to 50% of the signal at 20 psec compared to 10% and 20% in HbCO and MbCO, respectively (Figs. 1*A* and 2*A*). (*B*) Induced absorption at the maximum induced positive change (λ = 425 nm) (deoxyprotoheme) with the best fit (thin line) for τ_H = 380 fsec. ---- and –·–, as in Fig. 1. Note that in the induced absorption kinetics no relaxation can be observed in any of the three molecular species.

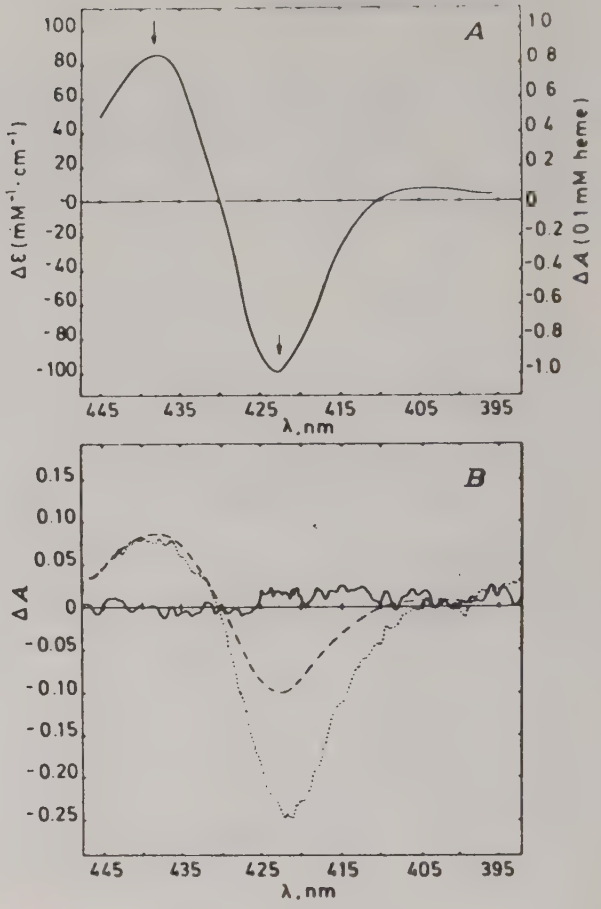


FIG. 4. (*A*) Stable difference spectrum of deoxy Mb and MbCO. Arrows indicate the wavelengths at which kinetic results shown in Fig. 2 were recorded. (*B*) Transient difference spectra of deoxy Mb and MbCO at 0 psec (——) and 5 psec (·····) after pulse excitation at 307 nm. The dashed line represents the calculated stable difference spectrum for 10% photodissociation corresponding to the Δ*A* measured at 438 nm. The transient spectrum was similar between 1 and 100 psec after excitation. Experimental conditions: MbCO 0.1 mM ($A_{422.5}$ = 2.1) in 0.1 M K phosphate pH 8 buffer at 25°C; 1-mm cell; excitation, 10 μJ, 250 fsec, at 307 nm. Spectra were recorded by replacing the two photodiodes at the output of the spectrophotometer by a two-dimensional optical multichannel analyzer (OSA, B.M., Spectronik). The digital processing was as follows. After the dark current is subtracted the reference track is divided by the probe track and its logarithm is calculated. The change in absorbance (Δ*A*) is the difference in absorbance between a delay of 0 psec or 5 psec and its value at −5 psec. It has been checked that the spectra were identical before and in the absence of excitation.

tion of CO from HbCO, MbCO, and CO-protoheme occurs within the 250-fsec of our pulse duration whereas the deligated species is formed with a 350-fsec time constant. The formation of the deoxy species is demonstrated by the appearance of the new absorption maximum at the same wavelength as that observed in the stable difference spectra. This is illustrated by the transient difference spectrum of Mb and MbCO at 0 and 5 psec after 307 nm excitation (Fig. 4) compared to the fully deoxy MbCO stable difference spectrum. Similar spectra were recorded after photolysis of HbCO and CO-protoheme solutions. It was also observed that, within experimental accuracy (20 Å), the isosbestic points at 417, 426, and 430 nm for protoheme, Hb, and Mb solutions, respectively, were close to those of the stable difference spectra.

The kinetics at the maximum of bleaching (Figs. 1*A*, 2*A*, and 3*A*) show a decay process more pronounced in the protoheme experiments (approximately 50% of the initial signal at 20 psec) than in HbCO or MbCO where it barely amounts to a maximum of 20%. This relaxation process is detectable only in the initial absorption spectra of the liganded species. This suggests the presence of excited liganded species which relax, at least in part, to the ground state with a time constant of 3.2 psec, identical for the three molecular species. Our results may be compared to the recent work on MbCO and MbO_2 by Cornelius *et al.* (3). The transient spectrum of MbCO shown in Fig. 4 is similar to spectra reported by these authors 6.6 and 100 psec after excitation. As they did, we observed no geminate recombination up to 100 psec. We demonstrate here that the "simultaneous development of both bleaching and absorption intensities" means actually a rate of growth for the absorption intensity of 350 fsec.

We should also point out that our Δ*A* transient spectra, like those published by Cornelius *et al.* (3), differ significantly from the stable Δ*A* deoxy Mb/MbCO spectrum. The source of this difference is not clear. It may be that these transient spectra are distorted due to some degree of inhomogeneity in the overlapping of the pump and the continuum beams. This appears to be unlikely because large changes in the excitation fluence, by factors of 2 or 3, did produce similar distorted spectra. Moreover, kinetic measurements, with a narrow band selected in the

continuum and two photodiodes as detectors, also revealed distorted amplitudes. Another possibility would be that about 50% of the bleaching in the Soret liganded peak corresponds to the formation of at least one excited MbCO* species with very broad and weak absorbance toward shorter wavelengths. The relaxation of the initial bleaching (20%) with a 3.2-psec time constant in part supports this hypothesis.

Recently, Reynolds and Rentzepis (18) published a ΔA spectrum at 200 psec after 25-psec excitation pulses which is almost identical to a Mb/MbCO DC difference spectrum. We cannot explain the discrepancy between their spectrum on the one hand and the spectra of Hochstrasser's group and ours because no precise information on the experimental conditions (excitation fluence, heme concentration, cell pathlength, etc.) used were given by Reynolds and Rentzepis. One cannot completely eliminate the influence of the pulse duration for values more than 3- to 4-fold above the 3.2-psec relaxation time constant, associated with multiphoton photodissociation processes.

Photodissociation Process. The kinetics of formation of the deoxy species suggest the existence of spin-allowed dissociation channels. This requires the instantaneous formation of a transient high-spin liganded species, highly photodissociative via an intersystem crossing. According to the notation of Chernoff *et al.* (6) this intermediate product is likely the HbCO $^5T_2$ state. We must point out also that, in spite of the different experimental conditions of this study (our excitation was at 32500 cm^{-1}), the transient difference spectra recorded in the HbCO experiments were similar to those reported by Chernoff *et al.* (6) but with less red shift and no broadening compared to the stable deoxy spectrum (Fig. 4). This means that, after excitation to a high-energy state by the 307-nm pulse, the liganded species relaxed through nonradiative, nonreactive channels to the lowest electronic states that will be efficiently populated. The $^5T_2$ state appears as a likely candidate (but unfortunately not unique) because it is very dissociative toward CO in bringing an electron in the antibonding dz^2 orbital which would lead to an increase of the Fe—CO bond distance.

Fig. 3*A* shows that the CO-protoheme excited photoproduct(s) relaxes completely to the ground state with a single time constant of 3.2 psec and with no evidence of recombination during the first 100 psec after photolysis. This resulted after 20 psec, in a difference spectrum similar to that of the stable deoxy CO-protoheme spectrum. It is difficult at the present time to explain this wide difference between the importance of the protoheme relaxation and that observed in HbCO and MbCO and the possible influence of the protein matrix on this process. The presence of a chloride ion at the 5th coordination bond in place of the N_ϵ of the proximal histidine (F8) in the protoheme as well as the presence of polyethylene glycol in the close vicinity of the heme (19) may contribute to a new electronic configuration. This could produce a direct relaxation pathway from the dissociative liganded-excited state to the ground state instead of the more complex dynamics including an intermediate nonreactive step with a life-time of more than 100 psec as observed in HbCO and MbCO.

Iron and Ligand Dynamics. It has been reported by Terner *et al.* (7) that partial out-of-plane displacement (20) of the high-spin Fe(II) occurred within 30 psec, their pulse duration. This result is supported by theoretical considerations on nuclear motions which allow movement of the iron atom in the range of 1 Å in the picosecond or even the subpicosecond time scale. Because our results imply the formation of high-spin Fe(II) deligated species with a time constant of 350 fsec, it is reasonable to postulate displacement of the iron out of the heme plane within the same time scale. The fact that we did not observe any change of the electronic spectra in the spectral region of the deliganded species between 1 and 100 psec strengthens this hypothesis.

It cannot be ruled out, however, that some out-of-plane displacement of the iron may account partially for the 350-fsec dynamics. The dynamics of the CO molecules must be also examined because in the first 100 fsec after photoexcitation, electronic changes in the coordination group upon ligation will modify the absorption electronic spectra. Indeed, the CO molecule interaction volume can be approximated as a sphere with a diameter of 4.4 Å (8). Starting with a bond length of ≈2 Å the magnitude of the displacement of the CO sphere must be at least 4 Å before the Fe–ligand interaction becomes negligible on the electronic state of the iron. Such a displacement may need a few hundred fsec to take place. At this stage, reliable well-founded theoretical considerations are needed to decide which of the data interpretations is the most likely. It is tempting to speculate that no induced absorbance change indicative of a deoxy stable species could appear as long as the ligand collides into the low-energy well in close proximity to the iron-porphyrin ring. Evidently much information will be gained by studying these reactions with oxygen as the ligand, at low temperatures, and with time-resolved resonance Raman spectroscopy.

We are most pleased to acknowledge the helpful discussions with Prof. M. Karplus and the technical and secretarial assistance of B. Bohn, J. Grellier, and S. Babilotte. This work has been supported in parts by the Direction des Recherches, Etudes et Techniques and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

1. Noe, L. J., Eisert, W. G. & Rentzepis, P. M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 573–577.
2. Reynolds, A. H., Rand, S. D. & Rentzepis, P. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2292–2296.
3. Cornelius, P. A., Steele, A. W., Chernoff, D. A. & Hochstrasser, R. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7526–7529.
4. Shank, C. V., Ippen, E. P. & Bersohn, R. (1976) *Science* **193**, 50–51.
5. Greene, B. I., Hochstrasser, R. M., Weisman, R. B. & Eaton, W. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 573–577.
6. Chernoff, D. A., Hochstrasser, R. M. & Steele, A. W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5606–5610.
7. Terner, J., Stong, J. D., Spiro, T. G., Nagumo, M., Nicol, M. & El Sayed, M. A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1313–1317.
8. Case, D. A. & Karplus, M. (1979) *J. Mol. Biol.* **132**, 343–368.
9. Alberding, N., Chan, S. S., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, D., Gunsalus, I. C., Nordlund, T. M., Perutz, M. F., Reynolds, A. H. & Sorenson, L. B. (1978) *Biochemistry* **17**, 43–51.
10. Huisman, T. H. J. & Dozy, A. M. (1965) *J. Chromatogr.* **19**, 160–169.
11. Gibson, Q. H. & Antonini, E. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 1384–1388.
12. Wang, J. H., Nakahara, A. & Fleisher, E. B. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1109–1113.
13. Ippen, E. P. & Shank, C. V. (1975) *Appl. Phys. Lett.* **26**, 92–96.
14. Treacy, E. B. (1969) *J. Quant. Electr.* **5**, 454–456.
15. Migus, A., Shank, C. V., Ippen, E. P. & Fork, R. L. (1982) *J. Quant. Electr.* **18**, 101–109.
16. Ippen, E. P. & Shank, C. V. (1977) in *Topics in Applied Physics*, ed. Shapiro, S. L. (Springer, New York), Vol. 18, pp. 83–122.
17. Etchepare, J., Grillon, G. & Orszag, A. (1982) *J. Quant. Electr.*, in press.
18. Reynolds, A. H. & Rentzepis, P. M. (1982) *Biophys. J.* **38**, 15–18.
19. Alberding, N., Austin, R. H., Chan, S. S., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Gunsalus, I. C. & Nordlund, T. M. (1976) *J. Chem. Phys.* **65**, 4701–4711.
20. Perutz, M. F. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 327–386.

Vol. 107, No. 3, 1982 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
August 16, 1982 Pages 803-810

FEMTOSECOND PHOTODISSOCIATION AND PICOSECOND RECOMBINATION OF O_2 IN MYOGLOBIN : A PLAUSIBLE EXPLANATION FOR THE LOW QUANTUM YIELD IN MbO_2

J.L. Martin, A. Migus, C. Poyart*, Y. Lecarpentier, A. Antonetti and A. Orszag

Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique - ENSTA
91120 Palaiseau, France

*INSERM, U27, 92150 Suresnes, France.

Received May 17, 1982

We have measured ΔA transient absorption spectra in the Soret region and kinetics of photodissociation of oxymyoglobin (MbO_2) solutions following excitation by pulses of duration 350 fsec and 10 μJ energy at 307 nm. We observed an instantaneous bleaching of the absorbance at 414 nm and the appearance of a broad, red-shifted absorption band in the 438-470 nm region with a time constant of 250 fsec indicative of the formation of a short-lived deliganded Mb^* species which relaxes to the stable Mb with a constant of 3.5 psec. Following this early relaxation, changes in absorption kinetics indicate also a geminate recombination process of constant $\tau = 100$ psec. These data demonstrate that the well established low quantum yield ($\phi = 0.03$) of photodissociation in MbO_2 is related both to the relaxation of an excited Mb^* state and to a fast geminate recombination process.

Contrasting with the easiness of photodissociation of carbon monoxide heme complexes, the low quantum yield (ϕ) of photodissociation of dioxygen heme bonds has been reported years ago (1-5). In myoglobin for example, the accepted values for ϕ_{CO} is 1 compared to $\phi_{O_2} = 0.03$ (1-3). If a difference between the energies of Fe-CO and Fe-O_2 bonds may account for the higher photodissociability of the Fe-CO complexes (6-8), this cannot explain the large difference observed between ϕ_{CO} and ϕ_{O_2}. The larger photodissociability of the Fe-CO bond has been attributed to the weak d_π(Fe)-π^*(CO) interaction compared to the d_{z^2}(Fe)-one pair ligand interaction which predominates in the Fe-O_2 bond (6). This will only influence the wavelength dependence of ϕ. Therefore one may expect similar ϕ values for both ligands if the energy of each single excitation photon is equal or larger than the energy of Fe-(ligand) bond. This being realized any difference in ϕ values should be due either to relaxation of excited states and/or to fast recombination processes. Such mechanisms have been demonstrated recently in HbO_2 by Chernoff et al (9) and in

0006-291X/82/150803-08$01.00/0
Copyright © 1982 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

HbCO by Friedman & Lyons (10). In MbO_2 solutions, Cornelius et al (11) have attributed the low Φ_{O_2} to the relaxation of various short-lived excited states produced by multiphoton processes. They did not observe any subnanosecond recombination using pulses of 8 psec duration, 10 μJ at 355 nm. Anticipating very fast photodissociative processes through excited states of subpsec life-time and/or recombination processes in the very first psec following excitation, we have used a recently developped subpsec laser photolysis technique to bring out more detailed informations on the primary photolytic processes in MbO_2 in a femtosecond time scale.

MATERIALS AND METHODS

Horse heart (HH) Mb^{3+} (Sigma type III) and sperm whale (SW) Mb^{3+} (Sigma type II) were converted to MbO_2 according to Rothgeb and Gurd (12), and diluted to 0.15 mM heme in 0.05 M Tris buffer pH9 or 0.1M phosphate buffer pH8 at 25°C. The full reduction of the samples was assessed by measuring the extinction coefficients with a Cary 219 spectrophotometer (12). Kinetics experiments were performed at room temperature (22°C) in a 0.1 cm quartz cell. During the experiments, the cell is moved horizontally so that each pulse at 10Hz excites a new region of the sample. Equilibrium spectra were recorded at the end of each run to insure the absence of degradation of the protein. Oxygen photolysis was performed by 500 fsec pulses generated by a passively mode locked C.W dye laser as described in detail elsewhere (13,14). Briefly the oscillator is made of a Rhodamine 6G dye jet stream as the active medium and of a malachite green-DODCI stream as saturable absorber. This system produces pulses of 500 fsec, 1nJ at 615 nm. These pulses are passively compressed using a grating pair technique to achieve 300 fsec pulses, and then passed through a three stage amplifier pumped by a Q-switched frequency doubled Nd-Yag laser (15). This set-up produces finally 300 fsec pulses with a peak intensity of 3 GW. Half the energy is used to generate a broad band subpsec continuum while the other half is focused into a 0.75 mm thick KDP crystal to produce 10 μJ pulses at 307 nm. The UV beam is the excitation beam which can be delayed by an optical delay line driven by a step motor. The continuum beam is splitted into two parts and used as a double beam spectrophotometric technique. Transient spectra in the Soret region (380 nm-470 nm) were recorded with a 2D optical multichannel analyzer Vidicon detector. Kinetics at given wavelengths were obtained by two diodes placed at the exit slit of a 0.25 m spectrometer . The two signals corresponding to the probe and reference pulses are directed through an electronic chain to a HP1000 computer integrating at least, in each run, 6000 laser pulses of discriminated energy.

RESULTS

Excitation of HH MbO_2 solutions at 307 nm with 300 fsec pulses results in a large negative peak of the ΔA spectrum at 414 nm corresponding to a bleaching of the fully liganded Soret band and induces a positive absorption band in the 440 nm deliganded Soret region (Figure 1). Identical results were obtained in SW MbO_2 and independently of O_2 concentration from 750 to 150 Torr PO_2. Whereas the maximum of the bleaching at 414 nm is fully formed at + 1 psec, the induced absorption at 440 nm appears with a time-lag but is fully achieved within 3 psec. Taking into account the

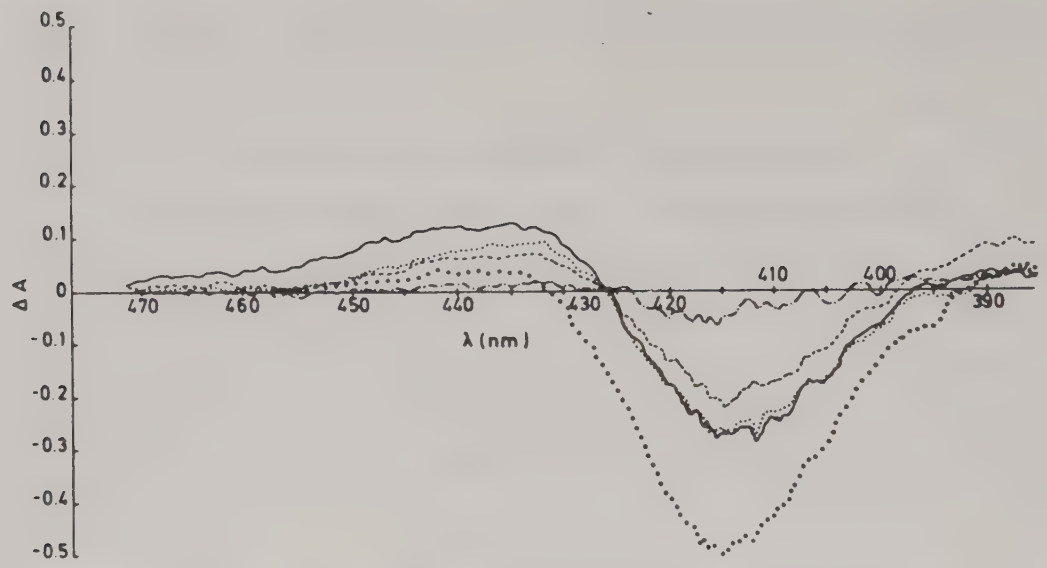


Figure 1 : Picosecond difference spectra following photodissociation of MbO_2 with 10 μJ, 350 fsec pulses at 307 nm. (•••• + 1 psec, —— + 4 psec, ... + 9 psec, ---- + 50 psec, —.—.— + 200 psec) after excitation). Note the broad red-shifted band occuring at + 4 psec (——) which relaxes to stable Mb species (.... 9 psec) and the symmetrical changes occuring in the spectrum after this initial relaxation.

various dispersive elements which affect the continuum beam, this delay can be partly attributed to a group velocity dispersion effect. In order to discriminate between this dispersion effect and a potential difference in the kinetics at 414 and 438 nm, we have recorded the changes in absorbances at these two wavelengths (Figure 2). The upper panel shows that the bleaching at 414 nm is instantaneous, taking into account a 0.3 psec pulse duration (instantaneous means that the impulse response of the system is a step function) (14). At 438 nm (middle panel) the induced absorption signal is not instantaneous but best fitted with an exponential response function of time constant τ = 250 fsec. The fully developed initial ΔA spectrum corresponding to the 1 to 4 psec time range after excitation is shown in Figure 1 (spectrum 4 psec). This reveals the formation of a deliganded Mb species with a broader absorption band extending up to 470 nm compared to a stable Mb spectrum. This transient excited species fully relaxes to the stable Mb product in the following 5 psec (+ 9 psec ΔA spectrum). The time constant of the decay of this excited species is 1.4 psec as measured from the kinetics of absorbance changes at, or near, the isosbestic point (424.5 nm). As shown also in Figure 1 no further change was noticed in

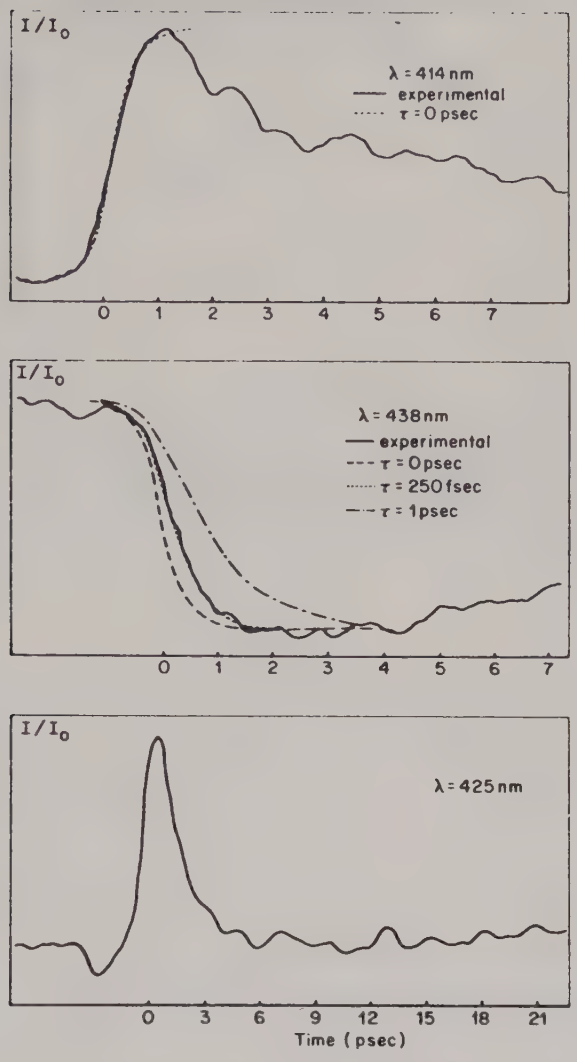


Figure 2 : Normalized early changes in absorption at specific wavelengths. Upper panel : kinetic of the bleaching at 414 nm, middle : kinetics of appearance of deoxy species at 438 nm. Lower panel : the kinetics of change at the isosbestic point indicative of the short lived excited species. Dotted and dashed lines correspond to best exponential fits with τ indicated in the figure.

the shape of the ΔA spectra following this early relaxation. However, we observed a simultaneous recovery of the bleaching at 414 nm and of the induced absorbance at 438 nm during the following 200 psec. This process was best quantified by the kinetic measurements in the 0 to 200 psec time scale illustrated in Figure 3. These records indicate unambiguously the existence of a two-step recovery process, a fast one described above as a relaxation process and a slower one of τ = 100 psec which, because of its symmetry, must be attributed to a recombination process.

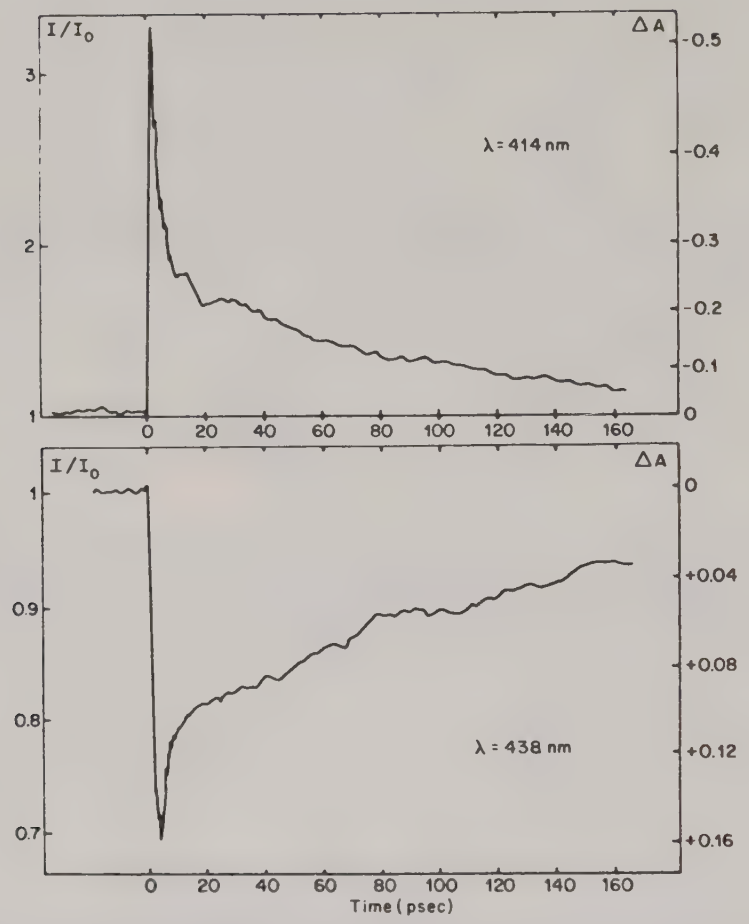


Figure 3 : Normalized changes in absorption (or ΔA left scale) in MbO_2 solutions following excitation at 307 nm. Note the presence of a two steps recovery process : relaxation and geminate recombination (τ = 100 ps).

DISCUSSION

The present results demonstrate that after excitation at 307 nm photodissociation of MbO_2 proceeds through a short-lived excited liganded state which relaxes (τ = 250 fsec) into an excited deliganded Mb species as indicated by the appearance of the red-shifted band in the ΔA spectrum and the kinetics recordings (Fig. 1 and 2). These data also suggest that the Mb^* excited species relaxes through 2 competitive channels : i) to a stable Mb species (τ = 3.5 psec) revealed by the evolution of the ΔA spectrum in the 450 nm region and ii) simultaneously to the ground liganded state as indicated by the partial recovery within the first 9 psec of the bleaching at 414 nm. Following these early events our results demonstrate also the existence of a geminate recombination phase (Figure 3) with a time constant τ = 100 psec. The recom-

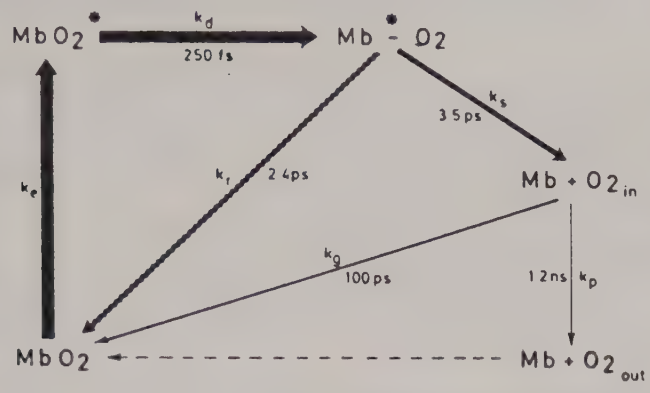


Figure 4 : Schematic model of the photodissociation process in MbO_2. MbO_2^* represents one or more excited liganded states, Mb^*-O_2 is the transient excited deliganded state, Mb + O_2 (in or out) are the stable deliganded states. Subscripts "in" and "out" indicate postulated oxygen molecules being in close vicinity of the heme and at distance of the active site respectively. Subscripts : e : excitation, d, dissociation, S, stable. r, relaxation, p, protein, g, ground state. The thicker the arrow, the faster the rate of the process. Values in the quantum yield of photodissociation have been calculated at each step of this process from the experimental time constants and relative amplitudes.

bination phase amounts to approx. 80 % of the initial photodissociated stable Mb product. These conclusions are summarized in the simple diagram shown in Figure 4 drawn according to the Ockham's razor principle. In this model all values have been computed from the direct kinetic measurements and from their relative amplitudes. This leads to postulate 2 behaviors for the oxygen molecules since the geminate recombination asymptote is not zero but still accounts for approx. 8 % of the initial deliganded oxygen molecules. It is postulated that these represent oxygen molecules in close vicinity of the heme (O_{2in}) and molecules which migrate at distance in (or already out of) the heme pocket (O_2 out). This model implies various quantum yield values at the different steps of the process. At the first stage of the appearance of the deliganded Mb^* species ϕ_1^* is estimated to be close to 0.8. At the second stage, corresponding to the appearance of the stable Mb product, ϕ_2 is approx. equal to 0.4. Finally after the completion of the geminate recombination ϕ_3 is equal to 0.03 in very good agreement with ϕ values measured at equilibrium (msec time scale) (1-3). Kinetics and spectroscopic measurements reported by Reynolds et al (16-17) differ noticeably from the present results in that these authors observed a delayed induced absorption (15-10 psec) at 440 nm compared to a bleaching at 420 nm within 5-10 psec after excitation. These discrepancies are likely due to differences in

pulse duration (8 or 25 psec) and excitation energy. Cornelius et al (11) reported transient difference spectra after photolysis of MbO_2 using 6 psec, 355 nm excitation pulses. Our initial ΔA spectra are similar to theirs in that they also observed a broad red-shifted band which they attributed to the formation of a Mb^* product. However difficult it may be to discriminate group velocity dispersion effects and the kinetics of appearance of a new species from ΔA spectra, they proposed a lifetime for intermediate species of τ = 13 psec in the photolytic pathway. We have shown here that the first step of the photolytic process is much faster (τ = 250 fsec) and does not need a two-step liganded excited path. This may be explained by the difference in the wavelength of our excitation pulse which at 307 nm may populate directly a highly photodissociative excited MbO_2^* state. It is more difficult to understand the kinetics of the relaxation $Mb^* \rightarrow Mb$ reported by Cornelius et al (11) (k_6 in their model) and why they did not observe any significant geminate recombination. This is likely due to the time resolution limited by their 6-8 psec pulse duration. Comparison of the photolytic process in MbO_2 with that observed in MbCO (13) confirms the large difference in the interaction of the two ligands with the heme site in hemoproteins (3-18). In MbCO we found a 350 fsec time constant for the photolytic process, no evidence of a deliganded Mb^* species and no recombination up to 200 psec after excitation. These differences illustrate the variation in the electronic distribution (8) in the heme upon binding the two ligands and/or of their behaviors in the heme pocket after photodissociation (19-20).

REFERENCES

1. Bücher, T., and Negelein, E. (1942) Biochem. Z. 311, 163-187.
2. Bücher, T., and Kaspers, J. (1947) Biochem. Biophys. Acta 1, 21-34.
3. Antonini, E., and Brunori, M. (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands* (North-Holland, Amsterdam).
4. Saffran, W.A., and Gibson, Q.H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7955-7958.
5. Sawicki, X.A., and Gibson, Q.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4058-4068.
6. Tsubaki, M., Srivastava, R.B., and Yu, N.T. (1982) Biochemistry 21, 1132-1140.
7. Rimaī, L., Salmeen, I., and Petering, D.H. (1975) Biochemistry 14, 378-382.
8. Perutz, M.F. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 327-386.
9. Chernoff, D.A., Hochstrasser, R.M., and Steele, A.W. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 5606-5610.
10. Friedman, J.M., and Lyons, K.B. (1980) Nature 284, 570-572.
11. Cornelius, P.A., Steele, A.W., Chernoff, D.A., and Hochstrasser, R.M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7526-7529.
12. Rothgeb, T.M., and Gurd, F.R.N. (1978) *Methods in Enzymol.* 52, 473-482.

13. Martin, J.L., Migus, A., Poyart, C., Lecarpentier, Y., Astier, R., and Antonetti, A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *In Press.*
14. Ippen, E.P., and Shank, C.V. (1977) *in Ultrashort light pulses, Topics in Applied Physics*, Vol. 18, Edit. Shapiro, S.L. Springer-Verlag, p 110.
15. Migus, A., Shank, C.V., Ippen, E.P., and Fork, R.L. (1982) Jour. Quant. Electron., QE-18, 101-109.
16. Reynolds, A.H., Rand, S.D., and Rentzepis, P.M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2292-2296.
17. Reynolds, A.H., and Rentzepis, P.M. (1982) Biophys. J. 38, 15-18.
18. Case, D.A., Huynh, B.H., and Karplus, M. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 4433-4353.
19. Gelin, B.R. and Karplus, M. (1979) Biochemistry 18, 1256-1269.
20. Austin, R.H., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Gunsalus, I.C. (1975) Biochemistry, 14, 5355.

ÉLECTRONIQUE QUANTIQUE. — *Amplification des impulsions subpicosecondes d'un laser à colorant et génération d'un continuum.* Note (*) de **Jean-Louis Martin, Raymond Astier, André Antonetti, Claude A. Minard** et **Alain Orszag,** présentée par Pierre Grivet.

L'impulsion subpicoseconde d'un laser à colorant à pompage synchrone a été amplifiée dans le domaine du millijoule pour produire un continuum s'étendant du proche infrarouge au proche ultraviolet.

The subpicosecond pulse from a synchronously pumped dye laser has been amplified in the millijoule range to generate a continuum spreading from the near ultraviolet to the near infrared.

1. INTRODUCTION. — Des impulsions subpicosecondes d'une énergie de l'ordre du nanojoule peuvent être obtenues avec un laser à colorant, soit par pompage continu et blocage de modes passif ([1], [2]), soit par pompage synchrone ([3], [4]). Ainsi ont pu être étudiés divers processus très rapides tels que la désactivation non radiative [5], la réorientation conformationnelle [6] et la relaxation vibronique [7] de molécules organiques, la restauration de l'absorption d'absorbant saturable [8].

Ces impulsions peuvent être émises dans une plage spectrale limitée : environ 20 nm dans le cas de pompage continu (la limitation est alors due à l'absorbant saturable), 40 à 50 nm avec le pompage synchrone où la seule limitation est celle du colorant.

Or, pour effectuer les mesures spectroscopiques sur des corps présentant, à l'échelle de la picoseconde, une absorption transitoire à spectre large, (molécules organiques ou biologiques) il s'avère nécessaire de disposer d'un fond spectroscopique plus étendu. Des continuums spectroscopiques ont déjà pu être engendrés en focalisant dans divers liquides des impulsions de 5 ps provenant de lasers néodyme à faible récurrence ([9], [10]). Très récemment, l'impulsion subpicoseconde d'un laser à colorant à blocage de modes passif a produit, après compression temporelle par réseaux optiques, puis amplification par étages de colorants et enfin focalisation dans un liquide, un continuum subpicoseconde étendu de l'ultraviolet à l'infrarouge [11]. Ce système a déjà permis d'étudier, à cette précision, la thermalisation de porteurs chauds dans un semi-conducteur excité optiquement [12] et l'absorption induite dans un semi-conducteur amorphe [13].

Dans la perspective d'études de relaxation moléculaire dans les colorants et de l'étude de spectres transitoires dans les molécules biologiques, nous avons réalisé un montage d'amplification optique d'impulsions subpicosecondes engendrées par un laser à colorant à blocage actif des modes. Cet amplificateur est constitué de 3 étages de colorant pompés par un laser « Yag » doublé en fréquence et délivrant 200 mJ en 12 ns à 530 nm. Par focalisation dans une cuve d'eau de ces impulsions amplifiées d'un facteur 10^6, nous avons obtenu, à la fréquence de 10 Hz, un continuum spectroscopique s'étalant du proche ultraviolet au proche infrarouge.

2. MONTAGE EXPÉRIMENTAL. — L'impulsion subpicoseconde à amplifier est fournie par un laser « Spectra-Physics » à pompage optique synchrone. Ce laser comprend un laser à argon ionisé Ar (*fig.* 1) dont le blocage de modes est obtenu par un modulateur acousto-optique ML thermostaté et commandé à 41 MHz par un générateur de fréquence ultra-stable FS. Les impulsions à 5 145 Å ont une durée de 150 ps et une puissance moyenne de 620 mW. Ces impulsions excitent un laser à colorant dont la longueur de cavité est rigoureusement ajustée à celle de la cavité du laser argon. Le colorant employé est la rhodamine 6 G.

La durée des impulsions du laser à colorant est mesurée en permanence dans un autocorrélateur Au mettant en jeu un doublage de fréquence par un cristal de IO_3Li, le déplacement du bras mobile étant assuré par un moteur pas à pas.

Ces impulsions sont adressées à un amplificateur optique à 3 étages de colorant C_1, C_2, C_3 pompés à la fréquence de 10 Hz par un laser « Yag » (Quantel 481) doublé en fréquence et fournissant des impulsions de 150 mJ à 530 nm, d'une durée de 12 ns. L'installation d'un doubleur de fréquence à la sortie du filtre dichroïque S_1 permet d'obtenir 50 mJ supplémentaires à 530 nm.

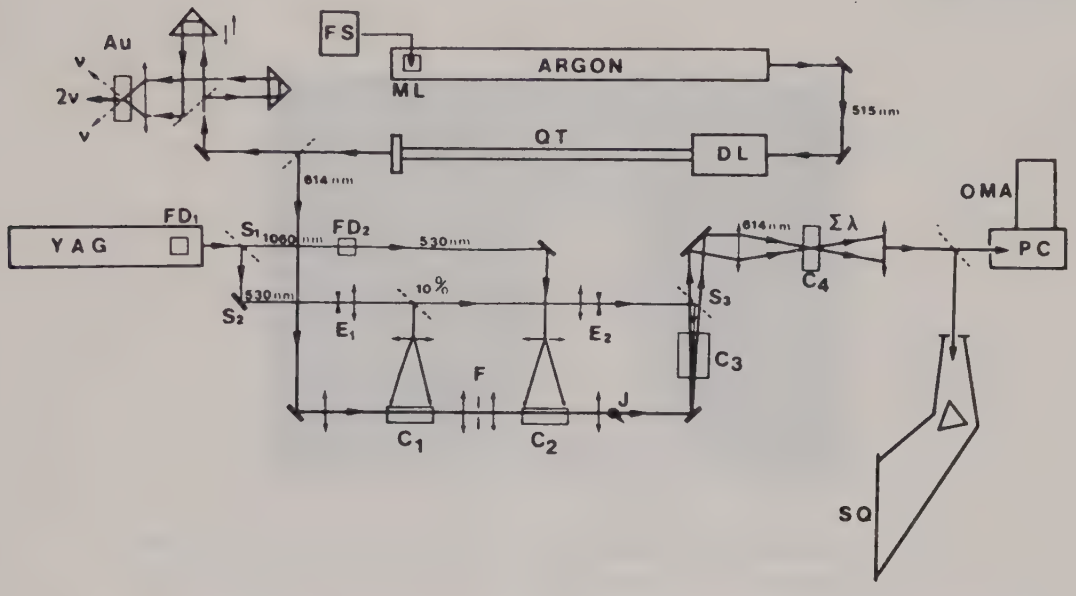


Fig. 1. – Montage expérimental. La partie supérieure gauche schématise l'autocorrélateur pour le contrôle continu de la largeur et de la forme de l'impulsion subpicoseconde. La partie droite représente les analyses spectrale et temporelle du continuum.

L'isolation pour éviter l'amplification de la fluorescence d'un étage au suivant est assurée par un filtre spatial F après le 1er étage et par un jet d'absorbant saturable après le 2e étage. A la sortie du dernier étage, l'impulsion amplifiée est focalisée dans une cuve d'eau où est engendré le continuum. Celui-ci est analysé spectralement par un monochromateur PC (M 25 Jobin-Yvon) équipé d'un analyseur optique multicanal « Oma » (Princeton Applied Research 1205 D), ou par un spectrographe à prisme de quartz SQ.

3. Résultats. – L'oscillateur « Spectra-Physics » a une puissance moyenne de 40 mW à 614 nm et la durée des impulsions, mesurée par autocorrélation du type II (à fond continu nul) est de 0,5 ps. L'impulsion subpicoseconde, récurrente à la fréquence de 82 MHz, a ainsi une énergie de 0,5 nJ et une puissance de 1 kW.

La figure 2 représente le résultat d'une autocorrélation échantillonnée sur un analyseur multicanal « Intertechnique IN 45 ». Chaque canal représente un déplacement de 10 μm du moteur pas à pas. La largeur à mi-hauteur est de 15 canaux, ce qui correspond à une largeur à mi-hauteur de 0,5 ps pour une impulsion à flanc exponentiel. Au cours d'une expérience

prolongée pendant 11 h, la durée de l'impulsion est restée comprise entre 0,5 et 0,8 ps et son énergie n'a pas varié de plus de 20 %.

Le passage dans l'amplificateur à 3 étages de colorants multiplie par un facteur voisin de 10^6 l'énergie de l'impulsion.

Le spectre du continuum obtenu dans une cuve d'eau a été étudié sur plaque spectrographique « Kodak 1 N ». Avec cette émulsion, on observe un spectre continu s'étendant de 300 à 900 nm, limité dans l'infrarouge par la sensibilité spectrale de la plaque.

Un tel continuum a pu être obtenu en faisant varier la longueur d'onde de l'impulsion de 580 à 620 nm.

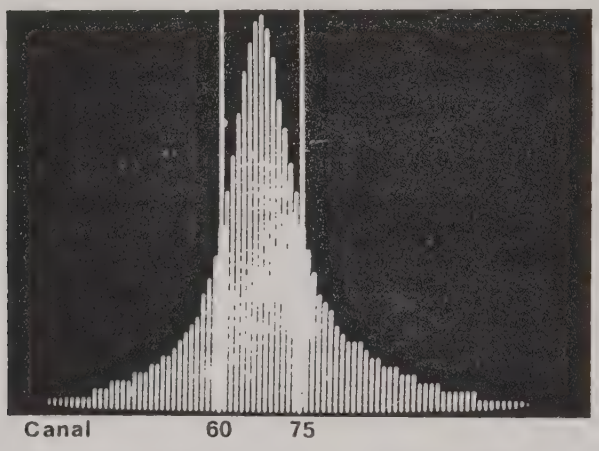


Fig. 2. — Oscillogramme de l'autocorrélation de l'impulsion subpicoseconde $\lambda = 614$ nm (pas du moteur : 10 µm, temps d'intégration : 0,5 s par canal et par pas).

4. Conclusions. — Le pompage optique synchrone d'un laser à colorant permet d'obtenir des impulsions subpicosecondes d'une puissance de l'ordre du kilowatt et d'une grande stabilité de durée et d'intensité. Amplifiée jusqu'au gigawatt puis focalisée dans une cuve d'eau, cette impulsion donne naissance à un continuum spectroscopique s'étendant du proche infrarouge au proche ultraviolet.

MM. C. V. Shank et A. Migus des laboratoires Bell Telephone à Holmdel (U.S.A.) et M. M. Malley, professeur à l'Université de San-Diégo (U.S.A.) ont contribué au succès de ces expériences qui ont reçu l'appui financier de la D.R.E.T.

(*) Remise le 25 juin 1979.

[1] C. V. Shank et E. P. Ippen, *Appl. Phys. Lett.*, 24, 1974, p. 373.
[2] I. S. Ruddock et D. J. Bradley, *Appl. Phys. Lett.*, 29, 1976, p. 296.
[3] R. K. Jain et C. P. Heritage, *Opt. Lett.*, 2, 1978, p. 117.
[4] J. N. Eckstein, A. I. Ferguson, T. W. Hänsch, C. A. Minard et C. K. Chan, *Opt. Comm.*, 27, 1978, p. 466.
[5] E. P. Ippen, C. V. Shank et R. L. Wœrner, *Chem. Phys. Lett.*, 46, 1977, p. 20.
[6] C. V. Shank, E. P. Ippen et O. Teschke, *J. Chem. Phys.*, 67, 1977, p. 5547.
[7] C. V. Shank, E. P. Ippen et O. Teschke, *Chem. Phys. Lett.*, 45, 1977, p. 291.
[8] E. P. Ippen, C. V. Shank et A. Bergman, *Chem. Phys. Lett.*, 38, 1976, p. 611.
[9] R. R. Alfano et S. L. Shapiro, *Chem. Phys. Lett.*, 8, 1971, p. 631.
[10] G. E. Busch, R. P. Jones et P. M. Rentzepis, *Chem. Phys. Lett.*, 18, 1973, p. 178.

[11] C. V. Shank, E. P. Ippen, R. L. Fork, A. Migus et O. Teschke, (à paraître).

[12] C. V. Shank, R. L. Fork, R. F. Lliheny et J. Shah, *Phys. Rev. Lett.*, 42, 1979, p. 112.

[13] R. L. Fork, C. V. Shank, A. M. Glass, A. Migus, M. A. Bosch et J. Shah, *Phys. Rev. Lett.*, 43, 1979, p. 394.

R. A., A. A. et A. O. : *Laboratoire d'Optique appliquée, École polytechnique, École nationale supérieure de Techniques avancées, Batterie de l'Yvette*, 91120 *Palaiseau*;

J. L. M. : *I.N.S.E.R.M.*, 101, *rue de Tolbiac*, 75645 *Paris Cedex* 13;

C. A. M. : *Spectra-Physics France, Z. I. Les Glaises, 3, rue Léon-Blum*, 91120 *Palaiseau*.

Picosecond Phenomena II

Proceedings of the Second International Conference
on Picosecond Phenomena
Cape Cod, Massachusetts, USA
June 18–20, 1980

Editors
R. Hochstrasser W. Kaiser C.V. Shank

With 252 Figures

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1980

A Model of Ultra-Short Pulse Amplification

A. Migus, J.L. Martin, R. Astier, and A. Orszag

Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique - ENSTA
F-91120 Palaiseau, France

1. Introduction

There has been recently important efforts devoted to the amplification of subpicosecond pulses, with laser pumped dye amplifier, in view of numerous applications in the domain of time-resolved spectroscopy. But still, little has been done for the theoretical understanding of such experiments. We develop here a theoretical model of laser pumped dye amplifiers to be compared to experimental arrangements which amplify subpicosecond pulses to gigawatt peak power [1,2].

2. Energy stored in a dye cell :

A dye cell, concentration N, is uniformly excited on a region of width and depth 2r, and length L ($r \ll L$). A simplified energy-level schema is considered with only the ground state S_0 and the first excited electronic state S_1 with lifetime τ. The pumping of a dye solution (Fig.1) with a pulse of intensity I_p and duration of a few τ results in the generation of an excited state population N_1 and two counterpropagating waves of amplified spontaneous emission (ASE) ψ^+ and ψ^-. Assuming conditions of steady state, strong pumping and important ASE, it can be shown [3,4] that the ASE flux can be considered as monochromatic with a wavelength λ_m which can be deduced from the rate equations. With these assumptions the equations take the simple form

$$\frac{d\psi^{\pm}}{dx} = (\sigma_{em} + \sigma_{am})\ \psi^{\pm} N_1 - \sigma_{am} N \psi^{\pm} \qquad (1)$$

$$N_1 = N \frac{\sigma_p I_p + \sigma_{am} (\psi^+ + \psi^-)}{\sigma_p I_p + \tau^{-1} + (\sigma_{em} + \sigma_{am}) (\psi^+ + \psi^-)} \qquad (2)$$

where σ_p, σ_{am}, σ_{em} are, respectively, the absorption cross-section for the pump, the absorption and emission cross sections at λ_m, and x the longitudinal coor-

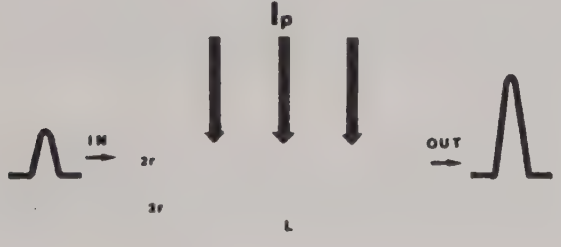


Fig.1 Geometry of pumping

dinate in the cell. This system gives exact analytical solutions. We present (Fig.2) the case of the first stage of our setup : a cell of Kiton Red ($N = 3.10^{17}$ cm^{-3}, $2r = 3.10^{-2}$ cm, $L = 3$ cm) pumped by a pulse of duration 12 ns, energy 30 mJ at wavelength 530 nm. More than the distribution of excited population, the important parameter is the density of excited molecules per transverse area unit

$$N_{st} = \int_0^L N_1(x)\,dx \simeq \frac{\sigma_{am}}{\sigma_{em}} NL + \frac{1}{\sigma_{em}} \ln \frac{\psi^+(L)}{\psi^+(0)} \qquad (3)$$

because one excited molecule has the potential to deliver one photon at the wavelength of the amplified pulse. The total amount of stored energy in the cell is equal to

$$E_{st} = 4r^2 N_{st} h\nu_\ell$$

where ν_ℓ is the frequency of the amplified pulse.

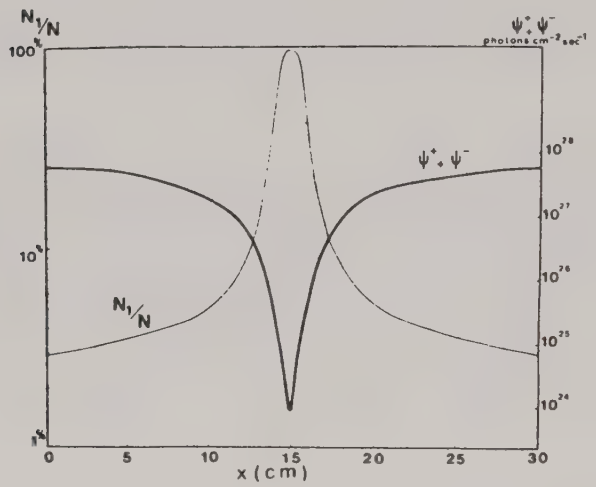


Fig.2 Flux of the A.S.E. and ratio of excited state population as a function of position in the cell (the parameters are in text).

For the above example ($\lambda_\ell = 613$ nm) we deduce $E_{st} \sim 20$ µJ which demonstrates that the permanent number of molecules reaching the state S_1 is much smaller than the number of photons in the pump pulse. This low efficiency can be explained as follows : the equilibrium is established within a time shorter than the expected time constant $\tau/1 + \sigma_\rho I_p \tau$ (and as a consequence shorter than the pump pulse duration) because of the depletion of S_1 due to the ASE ; then most of the pump photons coming after the steady state has been reached, do not increase the population N_1.

3. Amplification of ultrashort pulses

Once this steady state is reached a very short pulse of intensity I (x,t), t being its local time, travels in the excited medium. Writing the travelling wave equation along the longitudinal direction and the population rate equations [4] we get the pulse shape at the output x = L :

$$I(L,t) = \frac{\exp Z \exp E_0(t)}{1 + [\exp E_0(t) - 1] \exp Z} \; I(0,t) \qquad (4)$$

and

$$G = \frac{\ln [1 + (\exp E_0(+\infty) - 1) \exp Z]}{E_0(+\infty)} \qquad (5)$$

the gain in energy (Fig.3) with Z a parameter of stored energy :

$$Z = (\sigma_\ell + \sigma_a) N_{st} - \sigma_a NL$$

σ_ℓ, σ_a being the emission and absorption cross sections at λ_ℓ and

$$E_0(t) = (\sigma_\ell + \sigma_a) \int_{-\infty}^{t} I(x,t')\, dt'$$

the normalized energy contained in the pulse from the far leading edge to the local time t.

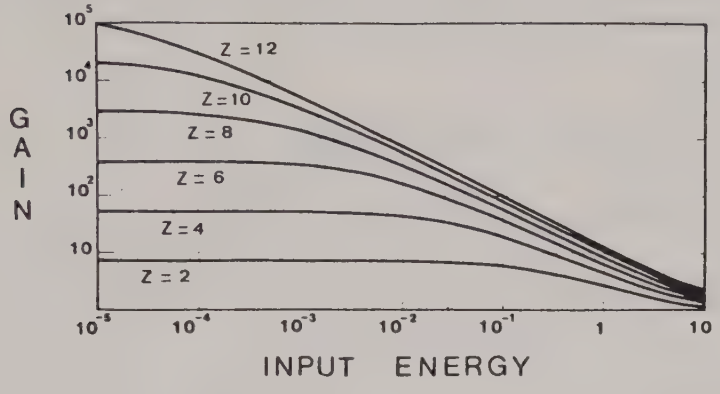


Fig.3 Gain of an amplifier stage as a function of the normalized input pulse energy , for different values of the stored energy parameter Z

We can conclude that a gain of 10^6 is impossible to reach with only one stage. An amplifier chain is needed, with increasing beam cross section. Nevertheless the amplifier stages are always driven in a near saturation regime, producing then distortion of the pulse shape. The analytical solution (4) takes into account the effects due to the pulse shape, and demonstrates the importance of a steep leading edge to avoid broadening. We present the shape of the amplified pulse for different input energy densities in two different cases : the input is gaussian (Fig. 4a) or is cosecant-like [5] (Fig. 4b).

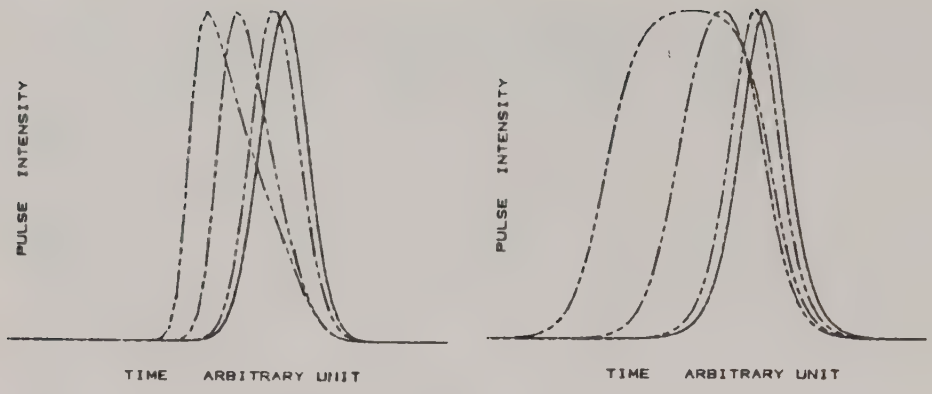


Fig.4 Normalized amplified pulse for a gaussian (Fig.4a on left) and cosecant like(Fig.4b on right) input pulse(continuous line) corresponding to three values of normalized input energy (1 , 0.01 and 0.0001 from left to right) for a stored energy parameter Z = 10 .

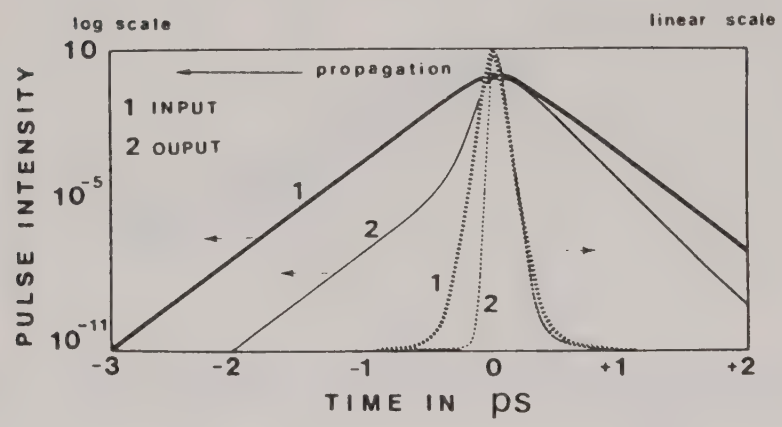


Fig.5 A cosecant like pulse through a malachite green jet. Curve 1 (curve 2) is the input (output) and continuous (disconti - nuous) line corresponds to a logarithmic (linear) scale .

4. Effect of saturable absorbers

To have not too much distortion we found that we had to avoid the case of deep saturation of the gain, but also to steepen the leading edge before the pulse was sent into an amplifier stage. For this last purpose a saturable absorber stream separates one stage from the next.

We solved numerically the equations of the saturable absorber in the case of fast recovery, and for given input shapes. To realize the goal of producing very steep leading edge while keeping a good transmission for the remaining part of the pulse we found that very concentrate solutions had to be used, and the beam tighly focused into the jet. As an example we present (Fig.5) the

pulse shaping of a cosecant like pulse, of energy 25 μJ, duration 0.5 psec, focused into a spot 200 μm diameter, through a Malachite green jet (small signal transmission 2.10^{-4} at 615 nm, recovery time : 2 ps) with an overall transmission close to 55 %.

5. Conclusion

The above theory gives results which are in reasonable agreement with the performance of different setups [1,2]. We could derive and check that a three stage dye amplifier pumped with a 30 MW pump pulse should amplify subpicosecond pulses (from a passively mode-locked dye laser) to energy of the order of one to two millijoules, without significant broadening. In particular we demonstrated the need to control the overamplification of the leading edge by using saturable absorber and by avoiding very deep saturation of the gain.

Our setup has been used in numerous applications. One of these experiments [6] gives some informations about the shape of the pulses. One of the interpretations of the Fig. 3b in ref. [6] may reveal that the amplified pulses present an exponential leading edge with a subpicosecond time constant and a much steeper trailing edge, result which would be in good agreement with our analysis.

This work has been supported by the Direction des Recherches, Etudes et Techniques.

References

1. C.V. Shank, R.L. Fork, R.F. Leheny and J. Shah, Phys. Rev. Lett., 42, 112 (1979).

2. J.L. Martin, R. Astier, A. Antonetti, C. Minard and A. Orszag, C.R. Acad. Sc. Paris, B 289, 45 (1979).

3. U. Ganiel, A. Hardy, G. Neumann and D. Treves, IEEE J.Q.E. 11, 881 (1975).

4. A. Migus, C.V. Shank, E.P. Ippen and R.L. Fork, to be published.

5. H.A. Haus, C.V. Shank and E.P. Ippen, Opt. Comm., 15, 29 (1975).

6. J. Etchepare, G. Grillon, A. Antonetti and A. Orszag : this issue.

Picosecond Phenomena III

Proceedings of the Third International Conference
on Picosecond Phenomena
Garmisch-Partenkirchen, Fed. Rep. of Germany
June 16–18, 1982

Editors
K.B. Eisenthal R.M. Hochstrasser W. Kaiser
A. Laubereau

With 288 Figures

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1982

Femtosecond Optical Pulses: Towards Tunability at the Gigawatt Level

A. Migus, J.L. Martin, R. Astier, A. Antonetti, and A. Orszag

Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique - ENSTA,
F-91120 Palaiseau, France

Since 1975 different kinds of dye lasers have been developed to generate subpicosecond pulses : CW pumped passively mode locked oscillators [1], synchronously pumped lasers or more recently CW mode locked ring lasers [2] which generate pulses of duration less than 100 femtoseconds. Many more applications become accessible when these pulses are amplified to powers in the gigawatt range [3,4] and particularly if one can utilize nonlinear optical phenomena to generate pulses at different wavelengths. In this paper, we describe new techniques for producing high power wavelength tunable subpicosecond pulses, starting from the amplified outputs of CW mode locked linear or ring dye lasers, generating a white light continuum pulse and amplifying any selected spectral part of it to GW peak power.

As initial laser we have first used a linear passively mode locked CW dye laser [1]. After passive compression through a grating pair the resulting pulses of energy 1 nJ and duration typically 0.5 psec were close to transform limited. The amplifier configuration [4] used with this oscillator employs three amplifier stages separated by saturable absorbers which help to prevent self-oscillation or overamplification of the leading edge. The pumping is realized with a Q-switched Nd-Yag laser which produces pulses of 1.7 J at 1.06 µm (14 ns duration) and 500 mJ at 0.53 µm with one single KDP. This set up which generates subpicosecond pulses of up to three GW peak power in the 610-620 nm spectral range has been used in time resolved spectroscopy experiments because such intense pulses have the capability of generating white light pulses of same duration. Up to now this continuum light has always been used as a weak probe (or interrogation) beam while the intense pump (or excitation) was at the fundamental wavelength or with much less energy at the second harmonic or at Stokes shifted frequencies. We have developed a technique which allows to produce high peak power subpicosecond pulses at a selected wavelength all over the visible spectrum by using one fraction of the 615 nm amplified beam to generate a continuum and by amplifying a selected part of it. In our experiment an interferential filter selected a few microjoules in a 7 nm spectral band centered at 575 nm. A second KDP crystal allows a pumping source of 200 mJ at 0.53 µm from the remaining 1.2 J at 1.06 µm. This green light pumped transversally one single 3 cm long amplifier stage containing a circulating solution of Rhodamine 6G. The transverse amplified pulse area was 0.15 cm². We can notice that synchronization is automatically realized once the initial amplifier is synchronized.

A gain saturation experiment has been performed by measuring the output pulse energy E (in µJ) as a function of the input energy E_0 (in µJ) with calibrated filters. The experimental points are in very good agreement with the theoretical saturation curve

$$E \sim 200\ \ell n\ [\,1 + 3.3\ E_0\,]$$ where E and E_0 are expressed in µJ

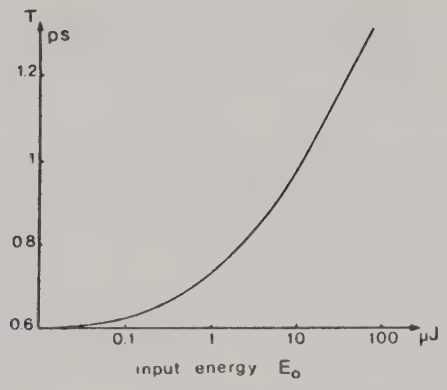


Fig. 1 Computed pulse broadening due to gain saturation. This curve does not take into account broadening due to group velocity dispersion.

obtained by following the computations of ref [5]. Output energies as high as 1 mJ have been obtained.

Pulsewidths were measured using background free S H G autocorrelation techniques. The propagation of such a large spectrum is associated with pulse temporal broadening due to group velocity dispersion in the dye solvent and the optics between the continuum generation and the KDP crystal. By extending the case of gaussian pulses, the pulsewidth τ, after propagating in different media of length L_m and group velocity dispersion D_m, can be approximated by

$$\tau = \left[\tau_p^2 + \left(\Delta\lambda \sum_m L_m D_m \right)^2 \right]^{1/2}$$

where τ_p = 0.6 ps is the initial pulsewidth (fig. 2) and $\Delta\lambda$ the amplified spectrum width. In our experimental conditions $\sum_m L_m D_m \sim 50$ fsec/nm.

While this effect can be compensated by the grating pair technique, this is not the case for gain saturation which is another strong factor of pulse broadening. Assuming a sech² pulse shape we have numerically [5] computed the output pulse width as a function of input energy (fig. 1). The theoretical prediction which takes into account all the broadening factors is then in very good agreement with the observed pulsewidths (fig. 2).

This technique can directly be extended to the infrared and the blue part of the spectrum by using the 355 nm obtained by tripling the remaining 1.06 μm.

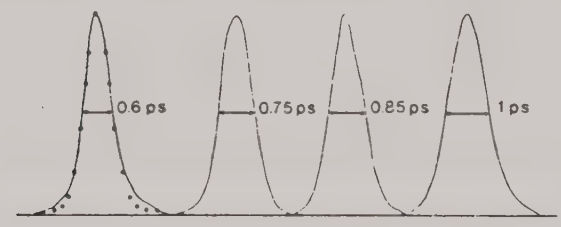


Fig. 2 Starting left : autocorrelation curve of the initial 1 mJ 615 nm pulse. The dotted curve corresponds to the autocorrelation of a sech² of duration 0.6 ps. The following autocorrelation curves demonstrate the effect of gain saturation (and of dispersion) on the pulse duration. They respectively correspond to the following energies : 100 μJ, 200 μJ and 400 μJ in a spectral band of 7 nm centered at 575 nm

This same technique can also be applied to much shorter pulses. Following the recent discovery of techniques for generating pulses in the femtosecond regime [2] and their amplification [6] we have built a ring laser in (fig.3) [7] and amplified the output pulses of duration 100 fsec at 618 nm to the mJ regime while keeping the same order of pulsewidth. Our oscillator is different from the one reported already [2] in that we did not include an intracavity pellicle etalon to avoid losses in the cavity. Instead we found the use of an external interference filter very effective to remove the red part of the spectrum. The output pulse is then transform limited with very clean rise and decay and a duration very independent of the laser fluctuations.

Our amplifier (fig. 3) is similar to the one developed by R.L. FORK and coworkers [6] in that it includes four stages of amplification separated by saturable absorber jets. The introduction of one more stage is of prime importance because of the low energetic input pulse (less than 50 pJ). As already noticed group velocity dispersion in the amplifier and in the optics before the KDP crystal implies temporal broadening. In our set up the estimated dispersion of 110 fsec/nm is compensated by a dispersive delay line composed of two 1200 g/mm diffraction gratings blazed at 630 nm, used at 50° and separated by a distance of 37 mm. Different solutions can be adopted : this compressor can be introduced after the last stage [6] but it implies then a loss factor which can be quite important (above five). It can be introduced at the oscillator output, but the resulting low energetic pulse is then difficult to separate from the fluorescence after the first stage of amplification. We have found that the optimum solution was to introduce the dispersive delay line after the second stage. In that case the satura-

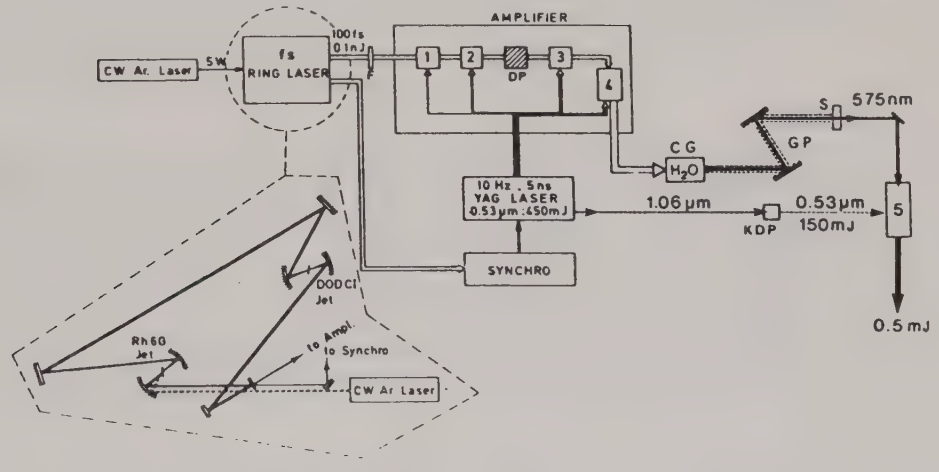


Fig. 3 Ring laser and amplification set up. F is an interferential filter. 1, 2, 3 are three transversally pumped amplifier stages followed by saturable absorber jets. 4 is a longitudinally pumped amplifier stage. DP is the dispersion compensation with a grating pair. The right part of the figure represents the set up for tunable continuum amplification. CG is the continuum generation cell, GP is a grating pair which compensates the further group velocity dispersion and S is the spectral selection. The stage 5 is pumped transversally by 150 mJ at 0.53 µm obtained from a second KDP crystal.

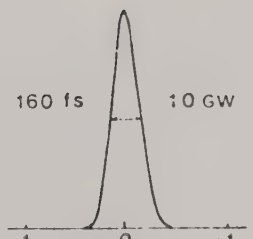


Fig. 4 Autocorrelation of the 10 Hz amplified pulse at 618 nm. Peak powers as high as 10 GW have been obtained

tion of the gain in the next two stages allows to recover a large part of the losses at the expense of a small temporal broadening. The output pulse with an energy well above 1 mJ has then a duration of 160 fsec (fig. 4).

This new set up has been applied in time resolved spectroscopy experiments using as excitation source the frequency doubled output pulses. In that case we found even shorter 309 nm UV pulses (fig. 4 [7]) with a duration of 100 fsec and an energy up to 20 μJ (0.2 GW peak power). The generation of less than 200 fsec tunable pulses by continuum amplification has been undertaken. To that effect we have modified our original set up (fig. 3) by introducing a grating pair (1000 g/mm and 25 mm separation) which takes care of the 45 fs/nm dispersion at 575 nm. On the opposite, we have then to shorten to 22 mm the separation of the gratings in the four stage amplifier.

In conclusion, we have shown that the main problem of broadening associated with group velocity dispersion can be overcome, and demonstrated that the technique of continuum amplification is a powerful tool to generate less than 200 fs tunable pulses in the GW range.

This work has been supported by the Direction des recherches, Etudes et Techniques.

References

1 C.V. Shank, E.P. Ippen, Appl. Phys. Lett. 24, 373-375, (1977).
2 R.L. Fork, B.I. Greene, C.V. Shank, Appl. Phys. Lett. 38, 671, (1981).
3 E.P. Ippen, C.V. Shank, "Subpicosecond Spectroscopy" in Picosecond Phenomena, ed. C.V. Shank, E.P. Ippen, S.L. Shapiro, Springer Verlag, 103-107, (1978).
4 A. Migus, C.V. Shank, E.P. Ippen, R.L. Fork, J. of Quan.Elec.18, 101 (1982).
5 A. Migus, J.L. Martin, R. Astier, A. Orszag, in Picosecond Phenomena II, Springer Verlag, 59-63 (1980).
6 R.L. Fork, C.V. Shank, R.T. Yen, to be published in Appl. Phys. Lett.
7 J.L. Martin, C. Poyart, A. Migus, Y. Lecarpentier, R. Astier, J.P. Chambaret. This issue.

Picosecond Phenomena III

Proceedings of the Third International Conference
on Picosecond Phenomena
Garmisch-Partenkirchen, Fed. Rep. of Germany
June 16–18, 1982

Editors
K.B. Eisenthal R.M. Hochstrasser W. Kaiser
A. Laubereau

With 288 Figures

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1982

Femtosecond and Picosecond Transient Processes After Photolysis of Liganded Hemeproteins

J.L. Martin, C. Poyart[1], A. Migus, Y. Lecarpentier, R. Astier, and J.P. Chambaret

Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique - ENSTA, F-91120 Palaiseau, France

Dynamical analysis of photolysis products in the picosecond time scale have allowed new insights in the early processes of heme-ligand interactions in myoglobin and hemoglobin [1-4]. In a preliminary experiment SHANK et al [3] demonstrated that photolysis of HbCO occurs in less than 0.5 ps.

We report here informations upon the photolysis pathways of CO or oxygen liganded myoglobin and hemoglobin in the 100 fs to 200 ps time range. To reach this time resolution, we have developed a femtosecond transient electronic absorption spectrometer using an amplified ring laser. We observed that photodissociation of the liganded species occurs with a 250-300 fs time constant followed in the next 200 ps by different spectral evolutions of the photoproducts as the ligand is O_2 or CO. A two-step recovery process including the relaxation of an excited deliganded species and a geminate recombination, is only apparent in the O_2 liganded species. These data provide a plausible explanation for the large difference in the quantum yield of photodissociation between CO and O_2 liganded species.

Purified hemoglobin solutions were prepared from fresh human blood through DEAE sephadex column chromatography and diluted in 0.05 M bis Tris or 0.1 M phosphate buffer, pH7 or 8 at ambient temperature. Myoglobin (sperm whale type II (SW) or horse heart type III (HH) from Sigma) was prepared following the procedure of ROTHGEB and GURD [5]. Dilutions of the stock solutions were made so as to obtain an absorbance of 2.2 at the peak of the Soret band after full ligation with either O_2 or CO. These solutions were introduced in a 0.1 or 0.05 cm light path quartz cuvette which was moved horizontally so that each pulse at 10 Hz excites a new region of the sample.

Photolysis was performed by 100 fs pulses generated by a passively mode-locked CW dye ring laser. Amplification of these pulses to the 10 GW regime is described in detail in this issue by MIGUS et al [6]. Briefly, the technique for generating optical pulses in the 100 fs range follows the principles described by R.L. FORK et al [7] with a slightly different configuration (fig. 1). Almost transform limited pulses are obtained by a spectral selection using coated mirrors and does not need intra cavity pellicle etalon. These pulses passed through a four stage amplifier pumped by a Q-switched frequency doubled Nd-Yag laser. A dispersive delay line is introduced at the output of the second stage to compensate the group velocity dispersion in the dye and optics at the level of the sample. This set up produces finally pulses at 10 Hz with energy above 1 mJ and 160 fs duration.

Half the energy is used to generate a broad band femtosecond continuum while the other half is focused into a 1.5 mm thick KDP crystal to produce

[1] INSERM U27, F-92150 Suresnes, France.

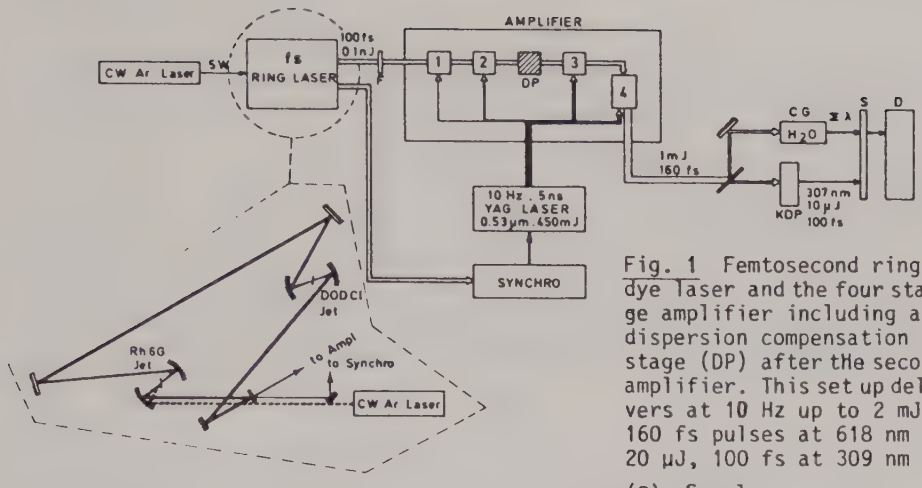


Fig. 1 Femtosecond ring dye laser and the four stage amplifier including a dispersion compensation stage (DP) after the second amplifier. This set up delivers at 10 Hz up to 2 mJ, 160 fs pulses at 618 nm or 20 µJ, 100 fs at 309 nm

(S) Sample
(D) Detector
(CG) Continuum generation

up to 20 µJ, 100 fs pulses at 309 nm. The UV beam is the excitation beam which can be delayed by an optical delay line driven by a step motor. The continuum beam is split into two parts and used in a double beam spectrophotometric technique. Transient spectra in the Soret region (380 nm-470 nm) were recorded with a 2D optical multichannel analyzer Vidicon detector. Kinetics at given wavelengths were obtained by two diodes placed at the exit slit of a 0.25 m spectrometer. The two signals corresponding to the probe and reference pulses are directed through an electronic chain to a HP1000 computer integrating at least, in each run, 6000 laser pulses of discriminated energy.

CO-Liganded Hemeproteins

In HbCO the rise of the bleaching at 419 nm (fig. 2), corresponding to the disappearance of the ground state liganded species, occurs within the pulse duration τ_p = 115 fs (instantaneous response). By contrast the induced absorption at 433 nm, taking into account the dispersion delay in the continuum beam, cannot be fitted to an instantaneous response. The best fit of the rate of appearance of the deoxy Hb species is obtained with τ_{Hb} = 300 fs (fig. 2). This value was found to be independent of pH, ionic strength and of CO concentration from 0.01 to 1 atm. Similar results were obtained with HH or SW MbCO solutions.

Fig. 3 illustrates the ΔA spectra recorded 5 and 50 psec after excitation of the MbCO sample. No other change in the ΔA spectra have been observed up to 200 ps after excitation. It may be noted also that the shapes of the transient spectra are similar to equilibrium ΔA spectra with no broadening at the longest wavelengths.

These results favor the proposal of a simple scheme of the photolytic pathways in CO liganded hemeproteins. These pathways imply the formation of a highly photodissociative excited species (XCO*) which relaxes for 50 % directly to the stable ground state deliganded species (τ = 300 fs) and to excited non dissociative liganded state(s). No recombination processes have been observed in the 200 ps time scale following excitation.

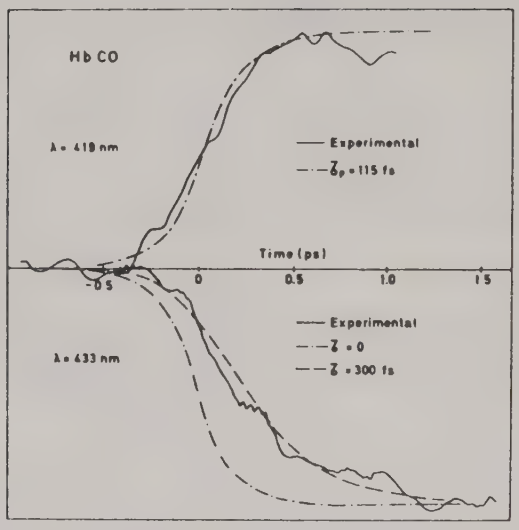


Fig. 2 HbCO : Kinetics of the bleaching at 419 nm and of appearance of the deoxy species at 433 nm. Centerline in the upper part corresponds to the instantaneous response computed with a pulse of duration τ_p = 115 fs. Centerline and dashed lines in the lower part correspond to exponential responses with τ indicated in the figure

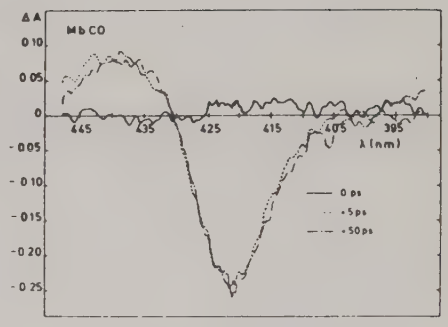


Fig. 3
MbCO : Transient difference spectra of deoxy Mb - MbCO at different delays after pulse excitation at 309 nm

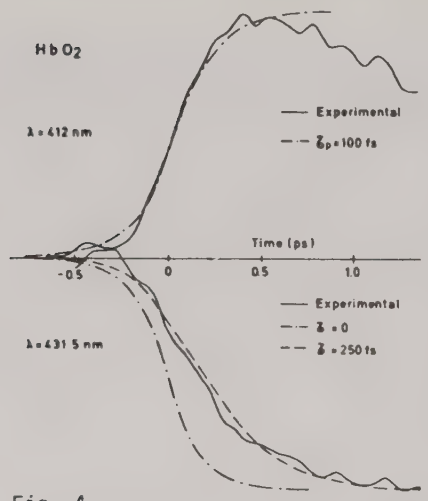


Fig. 4
HbO_2 : Kinetics of the bleaching at 412 nm and of appearance of the deoxy species at 431.5 nm. Normalized induced transmission (upper part) and induced absorption (lower part).

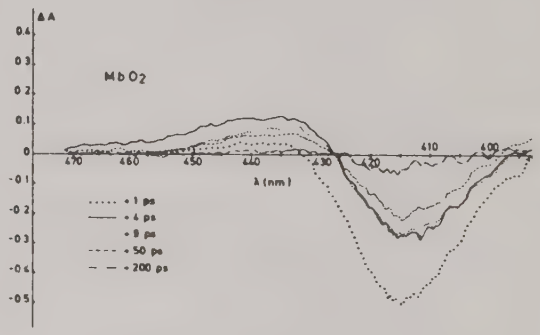


Fig. 5 Picosecond difference spectra following photodissociation of MbO_2. Note the broad red-shifted band occuring at + 4 ps which relaxes to stable Mb species (9ps) and the symmetrical changes occuring in the spectrum after this initial relaxation.

O_2 liganded hemeproteins

Fast kinetics of photodissociation in HbO_2 (fig. 4) are similar to those observed in HbCO or MbCO solutions. The time constant corresponding to the appearence of the deoxy species at 431.5 nm is 250 ± 20 fs. Identical values were measured in MbO_2 solutions. The fully developed initial ΔA spectrum corresponding to the 1 to 4 ps time range after excitation is shown in figure 5 (spectrum 4 ps). This reveals the formation of a deliganded Mb species with a broader absorption band extending up to 470 nm compared to a stable Mb spectrum. This transient excited species fully relaxes to the stable Mb product in the following 5 ps (+ 9 ps ΔA spectrum) (figure 5). The time constant of the decay of this excited species is 1.4 ps as measured from the kinetics of absorbance changes at, or near, the isosbestic point (424.5 nm). As shown in figure 5 no further change was noticed in the shape of the ΔA spectra following this early relaxation. However, we observed a simultaneous recovery of the bleaching at 414 nm and of the induced absorbance at 438 nm during the following 200 ps.

Conclusion

The present results demonstrate that photodissociation of CO or O_2 liganded hemeproteins proceeds through a very short-lived excited state which relaxes (τ=250 fs-300 fs) into a deliganded species [8,9]. The presence of O_2 as ligand induces an *excited* deliganded state as indicated by the red-shifted band in the ΔA spectra. Following these early events our results demonstrate also the existence of a geminate recombination phase of O_2 molecules with a time constant τ = 100 ps. These data give new informations in the pathways of photodissociation and imply that the low quantum yield of O_2 liganded hemeproteins is primarily due to relaxation of excited states to nondissociative states *and* also to a geminate recombination of O_2 molecules [9].

References

1 B.I. Greene, R.M. Hochstrasser, R.B. Weisman, W.A. Eaton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5255-59 (1978).
2 L.J. Noe, W.G. Eisert, P.M. Rentzepis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 573-577 (1978).
3 C.V. Shank, E.P. Ippen, R. Berson, Science, 193, 50-51 (1976).
4 P.A. Cornelius, A.W. Steele, D.A. Chernoff, R.M. Hochstrasser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7526-7529 (1981).
5 T.M. Rothgeb, F.R.N. Gurd, Methods in Enzymol, 52, 473-482 (1978).
6 A. Migus, J.L. Martin, R. Astier, A. Antonetti, A. Orszag, This issue (1982).
7 R.L. Fork, B.I. Greene, C.V. Shank, Appl. Phys. Lett. 38, 671 (1981).
8 J.L. Martin, A. Migus, C. Poyart, Y. Lecarpentier, R. Astier, A. Antonetti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, to be published.
9 J.L. Martin, A. Migus, C. Poyart, Y. Lecarpentier, A. Antonetti, A. Orszag, Biochem. Biophys. Res. Comm. In press.

Subpicosecond spectroscopic techniques in biological materials

J. L. Martin, A. Antonetti, A. Astier, J. Etchepare, G. Grillon, A. Migus
Laboratoire d'Optique Appliquée—Ecole Polytechnique—E.N.S.T.A., 91120 PALAISEAU. FRANCE

Abstract.

We report on two distinct techniques involving picosecond laser pulses ; for stereometry or tomoscopy experiments, we use a light scattering technique with a mode-locked Nd^{3+} glass laser ; it provides a submillimeter depth resolution. The spectroscopy of ultra short phenomena are obtained with a subpicosecond amplified mode-locked dye laser ; some preliminary results concerning the process of the cooperative mechanism taking place in the photolysis of hemoglobin complex are presented.

Steorometry and tomoscopy

Quantitative three-dimensional analysis of objects is often very useful in biology. Especially in organs with cavities such as the heart, it would be very interesting to investigate malformations or make spatio-temporal measurement of the volume of the cavity. Interferometric methods as holography and moiré interferometry have been in use for several years, but their utilization seems restricted for three dimensionnal records of large objects and they are unsuitable for three dimensionnal measurement with good resolution[1]. Recently, a stereometric imaging method based on laser rangefinding utilizing a mode-locked laser and a streak camera, has been reported[2]. The profile to be analysed which must have a time bandwidth product much smaller than that of the streak camera limited the object depth which could be recorded ; the problem becomes more difficult with moving objects. Furthermore such a system using a high-frame rate streak camera is very expensive. We describe a technique using a mode-locked laser to generate the light pulse and a high speed optical Kerr shutter which enables one to use an ordinary camera to record the range-gated image.

Experimental

A schematic of the experimental apparatus is shown in Figure 1. A mode-locked neodymium-glass laser generates a train of IR pulses (λ = 1060 nm) horizontally polarized, each of 10 psec duration with a peak power density of 400 MW/cm^2. These pulses generate second harmonic green pulses at 530 nm (6 psec) in a crystal of potassium dihydrogen phosphate (KDP) with 10 % conversion efficiency. A dielectric mirror transmits the 1060 nm light into an

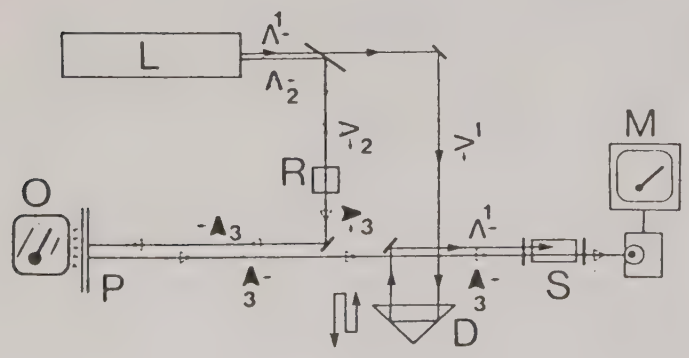


Figure 1 : Tomoscopy experimental apparatus
L : Nd^{3+} YAG laser - R : Raman cell -
D : delay line - P : diffusing screen -
O : object - S : Duguay shutter -
M : Detection and monitor
wavelengths : 1 : 1060 nm, 2 : 530 nm, 3 : 627 nm

Figure 2 : Stereometry of a wooden sphere

adjustable delay line and reflects the 530 nm light. The 530 nm pulses are focused with a 25 cm focal lens into a 5 cm length cell of ethanol. This gives power densities around 10 GW/cm^2 at 627 nm (3 psec). These stimulated Stokes Raman pulses are used to illuminate the object. The Duguay shutter[3] consists of a CS_2 cell located between crossed Polaroïd HN-22 polarizers (P_1, P_2). The 1060 nm pulses are plane polarized in the plane of the figure . They induce a time-dependent birefringence given by the convolution of the pulse duration and the relaxation time of the Kerr effect ; the transmission of the shutter increases from 10^{-5} to about 20 % at the maximum giving an on-off contrast better than 10^4.

By adjusting the length of the delay line, a plane perpendicular to the "z" dimension of the object can be selected by illuminating with 627 nm pulses, and then gating at the proper time to obtain the reflected image from the desired plane. With this technique the limit of the depth resolution is given by the convolution of the time dependent birefringence and the illuminating pulse. This gives, as it is shown Figure 2, a depth resolution of .75 mm. The pictures were obtained by illuminating a 30 mm wooden sphere, increasing the length of the delay line by .75 mm between each picture. With the same procedure, we have obtained pictures of the cavity of a heart where it is possible to distinguish details as the internal lip of the mitral valve (Figure 3). The picture has been realized on a non-beating isolated heart. The left cavity of the heart has been illuminated through a hole in the left ventricular wall made by a catheter (ϕ = .5 cm). A lens system adapted on this catheter collected the reflected image from different planes inside the heart cavity.

The feasibility of a tomoscopy experiment has been also demonstrated. A two crosses pattern was set on a 1 cm thick glass plate, one on each plane and tilted one to the other by an angle of 45°. By choosing the proper delay between the probing pulse and the IR pulse which activates the optical Kerr shutter, we can discriminate the back plane from the front plane. The Figure 4 shows on the left part the glass plate illuminated with the polarizers uncrossed, whereas the two other photos show the back and the front plane images obtained at two adequate time delays. The problem of a depth resolution through a material where the transmission is inhomogeneous is more difficult.

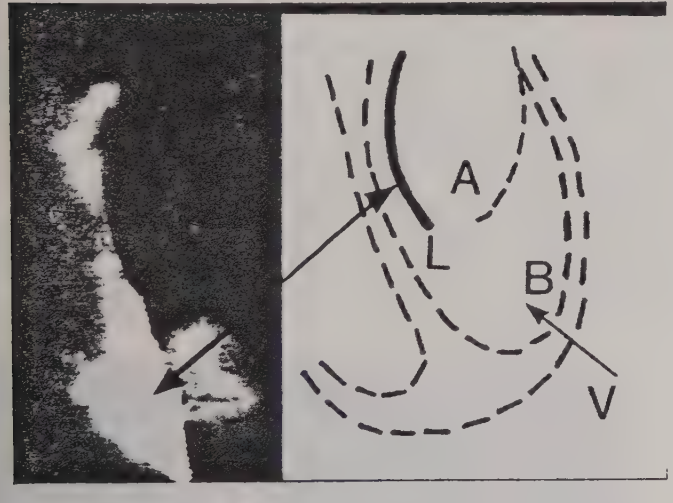


Figure 3 : View from apex (V) in the left ventricule (B) of the internal lip (L) of the mitral valve (A).

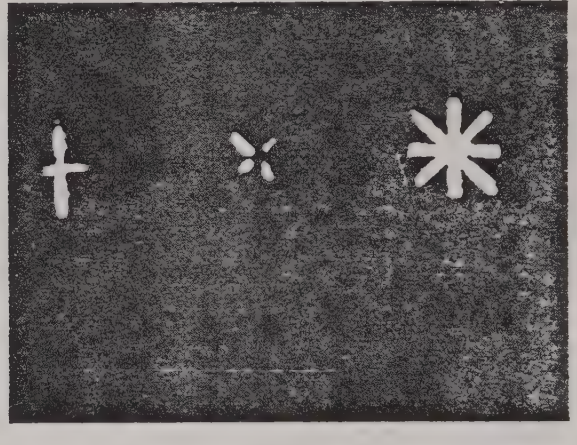


Figure 4 : Tomoscopy of the two faces of a glass plate.

Conclusion

Anyway, the topics of these experiments is only to give evidence of the feasibility of a three dimensional measurement of biological organs by use of a picosecond pulse coupled with an optical Kerr shutter. Major improvements are in progress to obtain a useful technique in the field of spatiotemporal analysis of biological forms : subpicosecond pulses with high repetition rate and higher speed optical shutters.

Subpicosecond spectroscopy

The development of short laser pulses in the last decade provided new tools for spectroscopic studies of phenomena taking place on a picosecond time scale. The extension of this technique in the subpicosecond regime offers new exciting possibilities by probing the previously unresolved elementary steps of biological or chemical reactions.

A major aim of the present work was to measure transient spectra in the visible region with subpicosecond resolution. To reach this goal, subpicosecond pulses from a passively mode-locked CW dye laser have been amplified, to produce pulses with a peak intensity of 2 GW while maintaining a 0.7 picosecond pulse width. Preliminary results, obtained on photolysis in the 450 nm - 500 nm region, are described here after.

Subpicosecond pulse generation :

For these spectroscopic applications, it is desirable to amplify low energetic subpicosecond pulses[4] to higher powers. Our arrangement is shown schematically in Figure 5. The input pulse (part A of the figure) is obtained from a passively mode-locked CW dye laser which utilised a prism (P) as dispersive element and two free flowing dye streams. The Rhodamine 6 G gain stream (J) is optically pumped by an CW Argon Laser (L); the second stream (SA) contains two saturable absorbers, DODCI and malachite green. An acousto-optic deflector (CO) dumps single pulse at repetition rate up to 1 MHz. These pulses are compressed through a grating pair (CI) to a duration under one picosecond. Half of the pulse energy is sent to a real time display of the pulse[5] (part B). In the figure 6, we present a typical autocorrelation trace, one division representing one picosecond duration. The other part of the pulse is sent to a three stage dye amplifier[6,8] (A_1,A_2,A_3) pumped by a frequency doubled Q-switched Nd-YAG laser (Y) in synchronism with the dumping of a subpicosecond pulse (part C). With this arrangement, we currently achieve output energies of about 1 mJ with 0.7 psec pulses at a repetition rate of 10 Hz. By focusing the amplified pulses into a 2 cm water cell (W), we have generated subpicosecond (continuum) pulses with a wavelength content extending from 0.3 μm to 1.2 μm.

Spectroscopic method :

The amplified subpicosecond pulses are used to initiate the photodissociation we are concerned with. The measure of the concentration of the new species resulting from the reaction are given by the variation of the absorption of the continuum pulses in an adequate spectral range ; the kinetic of the reaction is obtained by varying the delay between the exciting pulse (615 nm) and the probing pulse (continuum). The experimental set up is shown in the part D of the figure 5. The exciting pulses extracted from the continuum by a filter F_2 pass through a variable delay line and are focused in the sample (beam 2). Their delay is automatically and repetitively scanned by a stepping-motor-driven stage (M). The continuum beam is also focused into the sample (S) and then on the entrance slit of a 0.25 m spectrograph used in the second order of a 150-groove/mm grating. The resulting dispersed spectra are recorded by a SPECTRONIK OSA II Optical multichannel analyser system. For a given delay time, we obtain directly a full transient absorption spectrum with a spectral resolution of 1 nm.

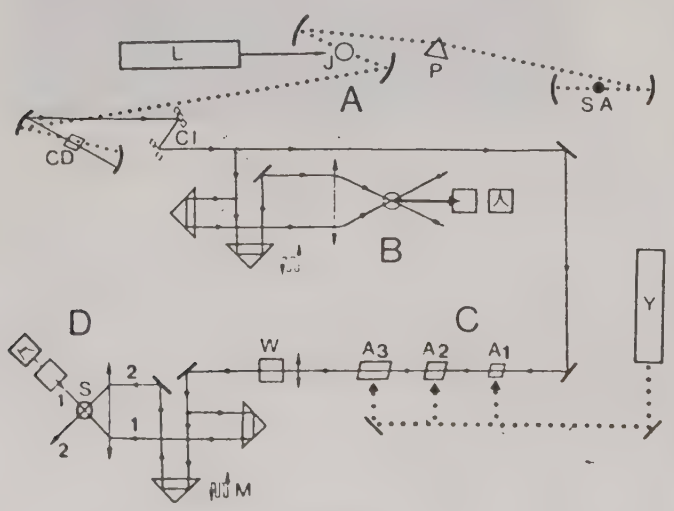


Figure 5
Subpicosecond spectroscopy apparatus

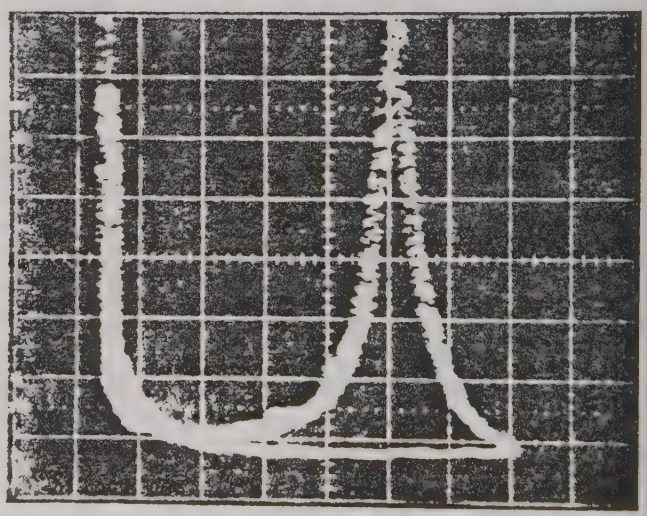


Figure 6
A real time autocorrelation trace of a pulse

Photodissociation of carbomonoxyhemoglobin

The results we describe are concerned with the important process of the so-called cooperative mechanism in the heme-heme interactions which appears during the photolysis of hemoglobine complexes[7].

This photolysis has been previously performed by SHANK et al.[4] in the subpicosecond time scale. They used a single subpicosecond pulse (0.5 psec) at 615 nm selected from a CW mode-locked dye laser to excite the samples, and a much weaker delayed image of the pulse to probe the induced absorption as a function of time delay. The repetition rate was 10 kHz and the energy per pulse was a few nanojoules. Under these conditions, it was concluded that CO dissociation occurs in less than 1 psec.

In contrast to the precedent experiment, the spectral absorption range used to test the creation of Hb or Hb like compound has been choosen using the opportunity of the continuum around 490 nm, where the difference in the coefficients of absorption of the two species HbCO and Hb is greater. Furthermore the high intensity (50 GW/cm^2) and the repetition rate (10 Hz) of the exciting pulse insure a quasi-total dissociation and a total recovery of Hb CO between two shots (the rate of carbon monoxidization is about 10 ms). The figure 7 shows the change of absorbance in the 450-550 nm region before and after (10 psec) excitation. Moreover, we did not found significant differences between the changes of absorbance at 10 psec and at 1 psec after the pulse excitation. This seems to confirm, as reported by SHANK et al. that the dissociation time is very brief.

Conclusion

The system described is a very efficient tool for subpicosecond absorption spectroscopy. Transient species can be identified and the chronography of very short events viewed. Nevertheless, other subpicosecond experiments, like Raman or resonant Raman spectroscopy, have to be developped, to corroborate and add informations obtained by absorption spectroscopy.

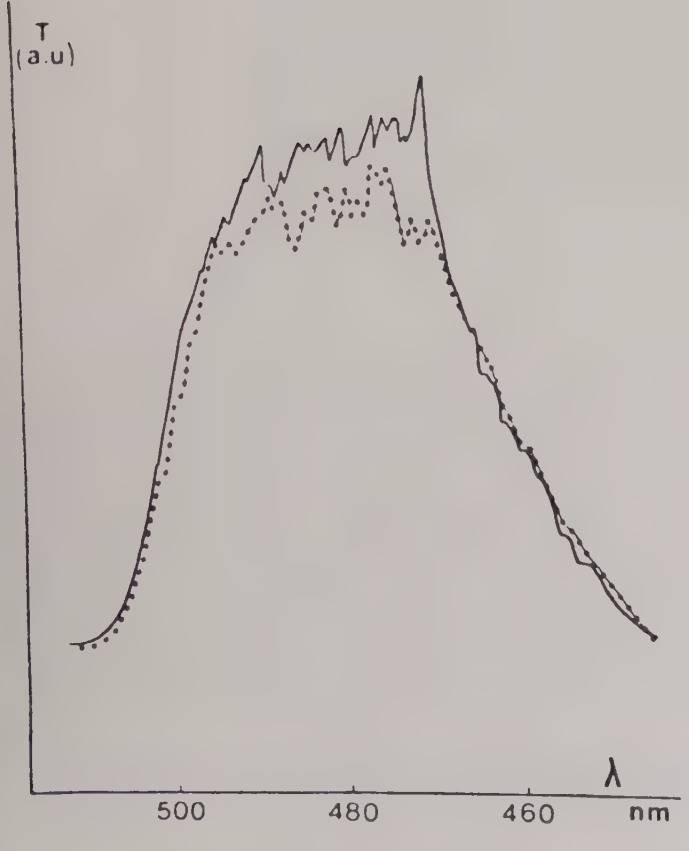


Figure 7 : Spectral transmission in arbitrary units of carbonmonoxyhemoglobin with an excitation at 615 nm and at 10 psec delay. The dotted line corresponds to the signal without excitation (delay - 5 psec)

References

1. H.J. Caulfield, T. Hirschfeld, J. Morris Weinberg and R.E. Herron, Proceedings of the IEEE, Vol. 65, January 1977.
2. M.J. Colles, Optics Communications, 1, p. 169,--1969.
3. M.A. Duguay and A.T. Mattick, Applied Optics, Vol. 10, N° 9, Sept. 1971.
4. C.V. Shank, E.P. Ippen and R. Bersohn, Science 193, 50, 1976.
5. R.L. Fork and A. Beisser, Appl. Opt. 17, 3534, 1978.
6. E.P. Ippen and C.A. Shank in Picosecond Phenomena, Springer Series in Chemical Physics, Vol. 4, Edit. C.V. Shank, E.P. Ippen and S.L. Shapiro, Springer Verlag, Berlin 1978.
7. J.L. Martin, R. Astier, A. Migus and A. Antonetti, Europhysics Conference Florence, Sept. 1979 (Comm. 55).
8. J.L. Martin, R. Astier, A. Antonetti, C.A. Minard et A. Orszag, C.R. Acad. Sc. Paris, t 289, 45, 1979.

GÉNÉRATION D'IMPULSIONS OPTIQUES INTENSES FEMTOSECONDES ET APPLICATIONS A LA SPECTROSCOPIE RÉSOLUE DANS LE TEMPS

par A. ANTONETTI (*), R. ASTIER (*), D. HULIN (**),
J. L. MARTIN (*), A. MIGUS (*) et A. ORSZAG (*)

RÉSUMÉ

Présentation des techniques permettant d'engendrer des impulsions lumineuses dans l'échelle temporelle des femtosecondes avec des puissances crêtes de plusieurs gigawatts dans une gamme spectrale s'étalant du proche ultraviolet à l'infrarouge. Ces sources utilisées en spectroscopie résolue dans le temps permettent l'étude des processus ultra-rapides comme la génération de plasma superdense dans les semi-conducteurs ou la photodissociation dans les hémoprotéines avec la mise en évidence d'état excité à très courte durée de vie et de recombinaison géminée rapide.

SUMMARY

We have developed new techniques for producing GW peak power optical pulses, in the femtosecond regime and with a new capability of wavelength tunability. Such an experimental advance gave us recently the possibility of the theoretical understanding of some ultrafast phenomena in solid-state physics or in biology: (1) formation of a superdense electron-hole plasma in CuCl, whose emission corresponds to a band gap renormalization effect; (2) existence of a very short lived excited state (250-300 fs) in the photodissociation of CO or O_2 hemoprotein; (3) explanation of the low quantum yield of dissociation of MbO_2 by relaxation of excited states and geminate recombination.

(*) Laboratoire d'Optique Appliquée, E.N.S.T.A., École Polytechnique 91120 Palaiseau.

(**) Groupe de Physique des Solides de l'École Normale Supérieure, 75005 Paris.

INTRODUCTION

Ces dernières années, quelques systèmes ont été mis au point pour engendrer des impulsions lumineuses ultrabrèves (10^{-13} s) avec des puissances crête supérieures au gigawatt. Le tableau résume les meilleurs résultats obtenus à ce jour.

TABLEAU

Génération d'impulsions lumineuses subpicosecondes par lasers et amplificateurs à colorants

CONFIGURATION	DURÉE ps	ENERGIE PUISSANCE CRÊTE	TAUX DE RÉPÉTITION	DOMAINE SPECTRAL nm
OSCILLATEUR À BLOCAGE DE MODES ACTIF	0,5	1 nJ 2 kW	82 MHz	570 ↘ 620
OSCILLATEUR LINÉAIRE, À BLOCAGE DE MODES PASSIF	0,4	1 nJ 2,5 kW	0 → 1 MHz	605 ↘ 620
IDEM + 3 ÉTAGES D'AMPLI POMPÉS PAR YAG	0,4	1 mJ 2,5 GW	10 Hz	
OSCILLATEUR EN ANNEAU, À BLOCAGE DE MODES PASSIF	0,07	0,1 nJ 1,5 kW	70 MHz	615 ↘ 620
IDEM + 4 ÉTAGES D'AMPLI POMPÉS PAR YAG	0,1	1 mJ 10 GW	10 Hz	
GÉNÉRATION D'UN CONTINUUM AMPLIFICATION SÉLECTIVE PAR YAG DOUBLE OU TRIPLE	0,2 0,1	1 mJ 5 GW	10 Hz	U.V. ↘ I.R.

A partir d'une technique de pompage synchrone par laser argon, technique bien définie et développée par J. P. Héritage et R. Jain [1] aux laboratoires de la « Bell Telephone », il a été possible d'engendrer des impulsions de 1 à plusieurs ps de durée, dans la bande spectrale de fluorescence de la Rhodamine 6G (580 à 620 nm). Plus récemment, G. Mourou et T. Sizer [2] de l'Université de Rochester (Laboratory for Laser Energetics) ont utilisé le même principe, mais avec un laser Yag continu à modes bloqués, en lieu et place du laser à argon ionisé. Cette nouvelle technique se prête bien à l'amplification des impulsions lumineuses subpicosecondes de l'oscillateur. En effet, le laser Yag pompant l'oscillateur peut aisément se synchroniser avec un second laser Yag utilisé pour pomper des cuves amplificatrices en série dans lesquelles transite l'impulsion subpicoseconde initiale. Actuellement, avec ce système et par un choix judicieux des colorants, on peut en fin de chaîne, à partir d'une impulsion initiale de 0,1 ps et 0,1 nJ, obtenir à 10 Hz une impulsion de 0,3 ps avec une énergie par impulsion de 0,2 à 0,3 mJ.

Avec un système utilisant un argon continu, on pompe une cavité linéaire (milieu amplificateur : jet de Rh6G, absorbant saturable : jet de DODCI + Vert de Malachite). Ce laser à modes bloqués par voie passive délivrant des impulsions de 0,5 ps a été mis au point par C. V. Shank et E. P. Ippen en 1975 [3] à la « Bell Telephone ». Avec l'aide de la DRET, de l'École Polytechnique et de l'E.N.S.T.A., nous avons, au Laboratoire d'Optique Appliquée, développé et amélioré ce système qui délivrait à 10 Hz des impulsions lumineuses de 300 à 400 fs (10^{-15} s) avec des énergies de quelques millijoules.

Un nouveau système très prometteur est constitué par un laser à cavité bouclée sur elle-même (laser dit en anneau), avec un milieu amplificateur (jet de Rh6G) et un jet d'absorbant saturable d'épaisseur très faible (10 à 30 µm). Deux impulsions laser prennent naissance dans le jet de Rh6G et se croisent dans l'absorbant saturable qui doit avoir une épaisseur aussi faible que possible. Elles y créent ainsi un réseau d'indice favorisant le blocage des modes. Ces impulsions peuvent avoir 70 à 90 fs de durée, et avec quelques précautions pour prévenir les effets de la dispersion normale de la vitesse de groupe, peuvent être amplifiées pour atteindre sans trop d'élargissement temporel des puissances crête de 10 GW [4]. C'est ce dernier système qui sera décrit en détail plus loin avec une extension par amplification du continuum [5] à des longueurs d'onde hors de la bande spectrale efficace de l'absorbant saturable qui nous limitait autour de 610 nm.

Ces différentes sources lasers nous ont permis de faire, par spectroscopie d'absorption résolue dans le temps, l'étude des processus ultra-rapides dans certains semi-conducteurs et dans des protéines hémiques. Une extension prometteuse de l'utilisation de ces impulsions femtosecondes est la génération d'impulsions électriques synchrones permettant :

— soit de déclencher une caméra à balayage de fente et faire de la luminescence résolue dans le temps et accumulable sans jitter;

— soit d'engendrer des « paquets d'électrons femtosecondes » pour faire de la diffraction résolue dans le temps;

— soit, après forte accélération dans un tube à vide, d'engendrer des « bouffées de rayons X » femtosecondes.

GÉNÉRATION ET AMPLIFICATION D'IMPULSIONS FEMTOSECONDES ET TECHNIQUES PICOSECONDES

Nous décrivons ci-après de nouvelles techniques utilisées dans notre laboratoire pour obtenir des impulsions subpicosecondes de puissance élevée (10^{10} W) dans une partie du spectre choisie à l'avance.

Comme laser de départ, nous avons d'abord utilisé un oscillateur linéaire à colorants, à blocage de modes passif et pompé par un laser argon continu [6]. A la sortie de l'oscillateur, et après compression temporelle par une paire de réseaux, l'impulsion a une énergie d'environ 1 nJ. Sa durée 0,5 ps est pratiquement limitée par la transformée de Fourier de son spectre. L'amplificateur d'énergie de l'impulsion [7] utilisé avec cet oscillateur, comporte trois étages successifs d'amplification par colorants. Ces étages sont séparés deux à deux par un absorbant saturable qui empêche l'auto-oscillation des étages et la suramplification du front avant de l'impulsion. Le pompage des colorants est assuré par un laser Nd-YAG déclenché (Q-switch) produisant à 10 Hz des impulsions de 1,7 J à 1,06 μm (durée 14 ns) ou 500 mJ à 0,53 nm par doublage de fréquence avec un cristal KDP. Les impulsions émises à 10 Hz à la sortie de l'amplificateur sont dans le domaine spectral 610 à 620 nm et ont une énergie supérieure à 1 mJ. Ayant conservé leur durée subpicoseconde, elles ont une puissance crête d'environ 3 GW. Avec ces impulsions, on peut alors produire, par interaction non linéaire, des impulsions de lumière blanche (continuum spectral), de même durée, utilisables dans les expériences de spectroscopie résolue dans le temps. Jusqu'à maintenant, la lumière de ce continuum était utilisée comme faisceau test dans les expériences « pompe-test », tandis que le faisceau d'excitation (pompe) était fourni par l'impulsion fondamentale ou, mais avec bien moins d'énergie, par doublage de fréquence de cette dernière ou encore aux fréquences Raman Stokes. Nous avons mis au point une technique qui permet de produire des impulsions subpicosecondes de puissance crête élevée à une longueur d'onde choisie dans tout le spectre visible, en utilisant une partie de l'impulsion 615 nm issue de l'amplificateur pour produire un continuum et en amplifiant une partie spectrale de ce dernier. Dans notre expérience, un filtre interférentiel découpe dans le continuum une bande spectrale de 7 nm centrée à 575 nm et d'une énergie de quelques microjoules. Un second doubleur de fréquence fournit une impulsion de 200 mJ à 0,53 μm à partir des 1,2 J résiduels à 1,06 μm. Cette impulsion verte pompe transversalement à 10 Hz un étage d'amplification d'une longueur de 3 cm où circule une solution de Rhodamine 6G. Dans la cellule d'amplification, la section transversale du faisceau amplifié est de 0,15 cm^2. On peut noter que la synchronisation de l'impulsion à amplifier avec l'impulsion excitatrice est réalisée dès l'instant que amplificateur à trois étages est lui-même synchronisé.

Une expérience de saturation du gain a été réalisée en mesurant l'énergie de sortie E (en microjoules) de l'impulsion amplifiée en fonction de l'énergie de l'impulsion d'entrée E_0 (en microjoules), à l'aide d'atténuateurs calibrés. Les points expérimentaux sont en très bon accord avec la courbe théorique de saturation obtenue d'après les calculs effectués en [8] :

$E \sim 200 \ln [1 + 3{,}3\, E_0]$ où E et E_0 sont exprimés en microjoules, l'énergie d'excitation étant constante.

Nous avons obtenu à 575 nm des impulsions amplifiées d'une énergie de 1 mJ.

La durée des impulsions a été mesurée par la technique de l'autocorrélation par doublage de fréquence à minimum nul. La propagation, dans les milieux dispersifs, de l'impulsion à spectre relativement large, se traduit par un élargissement temporel produit par la dispersion de la vitesse de groupe dans le solvant du colorant et dans l'optique entre la génération du continuum et le cristal de KDP. Avec des impulsions gaussiennes et après propagation dans différents milieux de longueur L_m et de dispersion de vitesse de groupe D_m, la durée τ de l'impulsion peut être obtenue par :

$$\tau = [\tau_p^2 + (\Delta\lambda \sum_m L_m D_m)^2]^{1/2},$$

où $\tau_p = 0{,}6$ ps est la durée initiale (*fig.* 1) et $\Delta\lambda$ la largeur du spectre amplifié. Dans nos conditions expérimentales : $\sum_m L_m D_m \sim 50$ fs/nm.

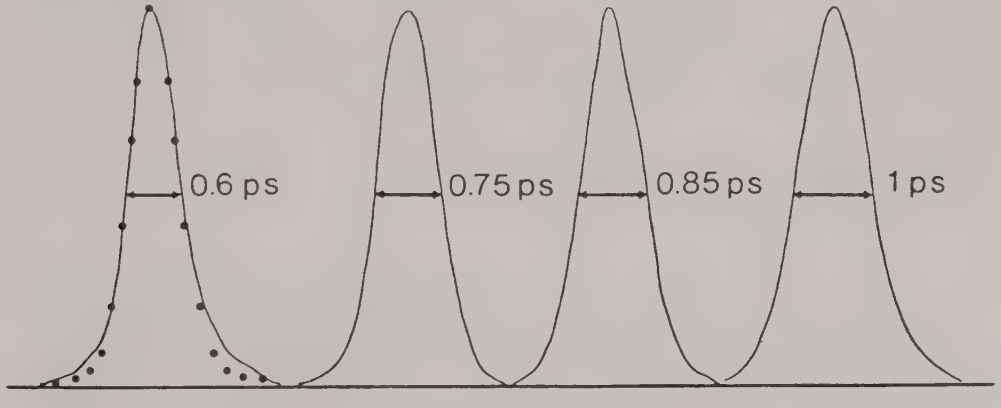


Fig. 1. — Courbes d'autocorrélation de l'impulsion. La courbe de gauche (ponctuée) correspond à une impulsion de forme sécante hyperbolique carrée (sech^2) de durée 0,6 ps. Les courbes suivantes montrent l'effet de saturation du gain (et de la dispersion). Elles correspondent respectivement aux énergies suivantes : 100 µJ, 200 µJ et 400 µJ dans une bande spectrale de 7 nm centrée à 575 nm.

Cet élargissement temporel peut être compensé par la technique de compression à deux réseaux, ce qui ne peut être fait pour l'élargissement dû à la saturation du gain. Les prédictions théoriques qui prennent en compte tous les facteurs d'élargissement sont en bon accord avec les durées observées (*fig.* 1).

Cette technique peut être étendue à l'infrarouge (par le seul changement du colorant), et aussi à la partie bleue du spectre en modifiant le pompage (par triplement de fréquence du 1,06 µm → 0,355 µm).

Cette même technique peut aussi être appliquée à des impulsions nettement plus courtes. Après l'apparition des techniques de génération d'impulsions femtosecondes [9] et de leur amplification [10], nous avons construit un oscillateur en anneau et amplifié ses impulsions de 100 fs à 618 nm en conservant leur durée et en portant leur énergie au millijoule. Pour éviter des pertes dans la cavité de cet oscillateur, nous n'y avons pas introduit de film mince (étalon FP) comme en [9]. A la sortie de l'oscillateur, un filtre interférentiel permet de supprimer la partie du spectre de plus grande longueur d'onde. L'impulsion a alors des flancs très nets et sa durée, limitée par la transformation de Fourier de son spectre, est indépendante des fluctuations laser.

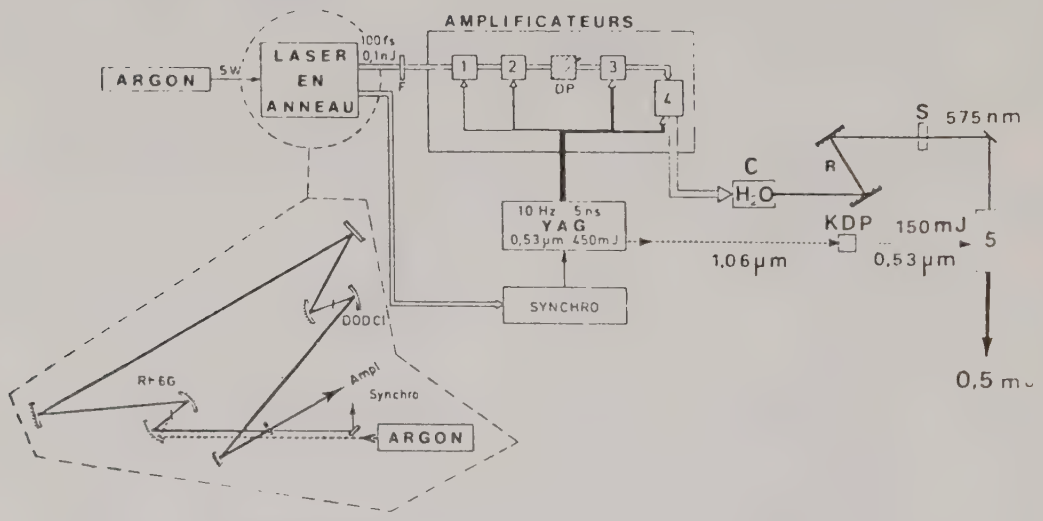


Fig. 2. — Oscillateur laser en anneau et montage d'amplification F : filtre interférentiel. 1, 2 et 3 : étages d'amplification pompés transversalement et suivis de jets d'absorbant saturable. DP : compensateur de dispersion à deux réseaux. La partie droite de la figure représente le montage d'amplification accordable du continuum. C : cuve de génération du continuum. R : paire de réseaux pour compenser la dispersion de l'amplificateur et du continuum. S : sélection spectrale. L'étage 5 est pompé transversalement par 150 mJ à 0,5 µm obtenus à partir d'un deuxième cristal KDP.

Notre amplificateur (*fig.* 2) est semblable à celui réalisé par R. L. Fork *et al.* [10]. Il comporte en effet quatre étages d'amplification séparés par des jets d'absorbant saturable (Vert de Malachite). L'introduction d'un quatrième étage est nécessitée par la faible énergie de l'impulsion à l'entrée du premier étage : moins de 50 pJ. Comme mentionné précédemment, la dispersion de la vitesse de groupe, dans l'amplificateur et l'optique située avant la mesure dans un cristal de KDP, produit un élargissement temporel.

Dans notre installation, la dispersion estimée à 110 fs/nm est compensée par un compresseur à deux réseaux de 1 200 t/mm, blazés à 630 nm, distants de 37 mm et utilisés à l'incidence 50°. Différentes solutions peuvent être adoptées : ce compresseur peut être placé après le dernier étage [10], mais il introduit alors sur l'impulsion de sortie un facteur de pertes supérieur à 10. Il peut être aussi placé à l'entrée du premier étage, mais alors le faible signal issu de cet étage est difficile à séparer de la fluorescence. L'impulsion de sortie est optimale (> 1 mJ, 160 fs) lorsque le compresseur se trouve après le deuxième étage. Dans ce cas, la saturation du gain dans les deux étages suivants permet de compenser en grande partie les pertes du compresseur, au prix d'un léger élargissement temporel (*fig.* 3).

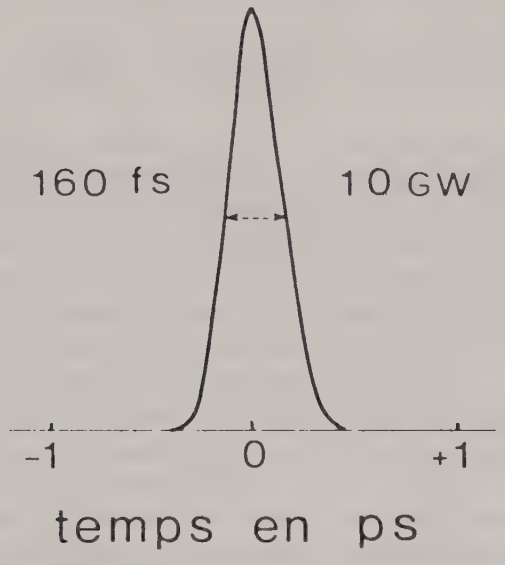


Fig. 3. — Autocorrélation de l'impulsion 618 nm amplifiée à 10 Hz. Des puissances de crête de 10 GW ont été obtenues.

Ce montage a été utilisé dans des expériences de spectroscopie résolue dans le temps utilisant comme source d'excitation l'impulsion de sortie de l'amplificateur (618 nm) doublée en fréquence. Dans ce cas, on constate que l'impulsion harmonique à 309 nm est plus courte (100 fs) que l'impulsion fondamentale, avec une énergie d'environ 20 μJ, soit une puissance crête de 0,2 GW.

Les expériences de spectroscopie résolue dans le temps ont été réalisées suivant le schéma classique de faisceaux excitateurs et tests (*voir* la figure 4). Dans les deux expériences que nous décrivons dans cette présentation, le faisceau excitateur est obtenu par doublage en fréquence d'une partie du fondamental. On obtient typiquement des impulsions d'énergie de l'ordre de 10 μJ à 309 nm, et d'une durée inférieure au fondamental (100 fs). Nous

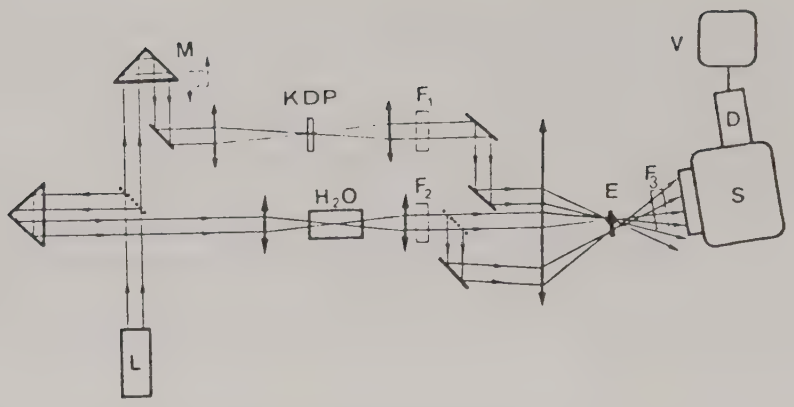


Fig. 4. — Schéma de principe de la spectroscopie résolue dans le temps.

utilisons un double faisceau de continuum, le faisceau direct (le test) passant dans la partie excitée de l'échantillon, tandis que le faisceau indirect (la référence) passe hors de l'échantillon. Ces deux faisceaux sont alors focalisés sur la fente d'un spectromètre de 0,25 m de focale et au 1er ordre d'un réseau à 600 traits/mm. On peut utiliser alors un analyseur optique multicanal qui enregistre les deux spectres pour un retard optique (donc temporel : 300 μm = 1 ps) donné entre l'impulsion excitatrice et l'impulsion test, effectue le rapport du faisceau référence par le faisceau test et prend le logarithme décimal. On obtient directement de la sorte le spectre d'absorption de l'échantillon pour un retard donné (précision $\sim$ 6 fs) et ses variations. Les cinétiques fines à une longueur d'onde donnée sont mesurées de façon différente : les énergies des impulsions test et référence sont observées par deux diodes. Les deux signaux correspondants sont pris en compte par une chaîne d'acquisition vers un ordinateur qui prend leur rapport et les traite suivant une fonction multicanale. Chaque balayage comporte 100 points de mesure, et typiquement 20 à 40 balayages sont suffisants pour obtenir un bon rapport signal/bruit.

SPECTROSCOPIE RESOLUE DANS LE TEMPS DANS LES SEMI-CONDUCTEURS : DYNAMIQUE DES POPULATIONS EXCITONIQUES. DURÉE DE VIE DE PLASMA ET DE PORTEURS.

L'étude des semi-conducteurs avec les impulsions de durée subpicoseconde amplifiées présente deux caractéristiques particulièrement intéressantes : d'une part, on dispose d'une résolution temporelle meilleure que la picoseconde, ce qui est important pour tous les phénomènes de relaxation rapide, d'autre part, on peut étudier les comportements de la matière

soumise à des flux très intenses jusqu'à 10^{12} W/cm^2 (optique non linéaire), et ceci sans créer de dommages sur l'échantillon car l'énergie déposée pendant le dixième de picoseconde que dure l'impulsion est très faible. Les deux études décrites ci-dessous (Cu_2O et CuCl) utilisent cette double propriété.

1. Absorption induite dans Cu_2O

Cu_2O est un semi-conducteur à gap direct mais où la transition optique vers l'état excité de plus basse énergie (exciton $n=1$ de la série jaune) est interdite au premier ordre, ce qui a pour conséquence un long temps de vie

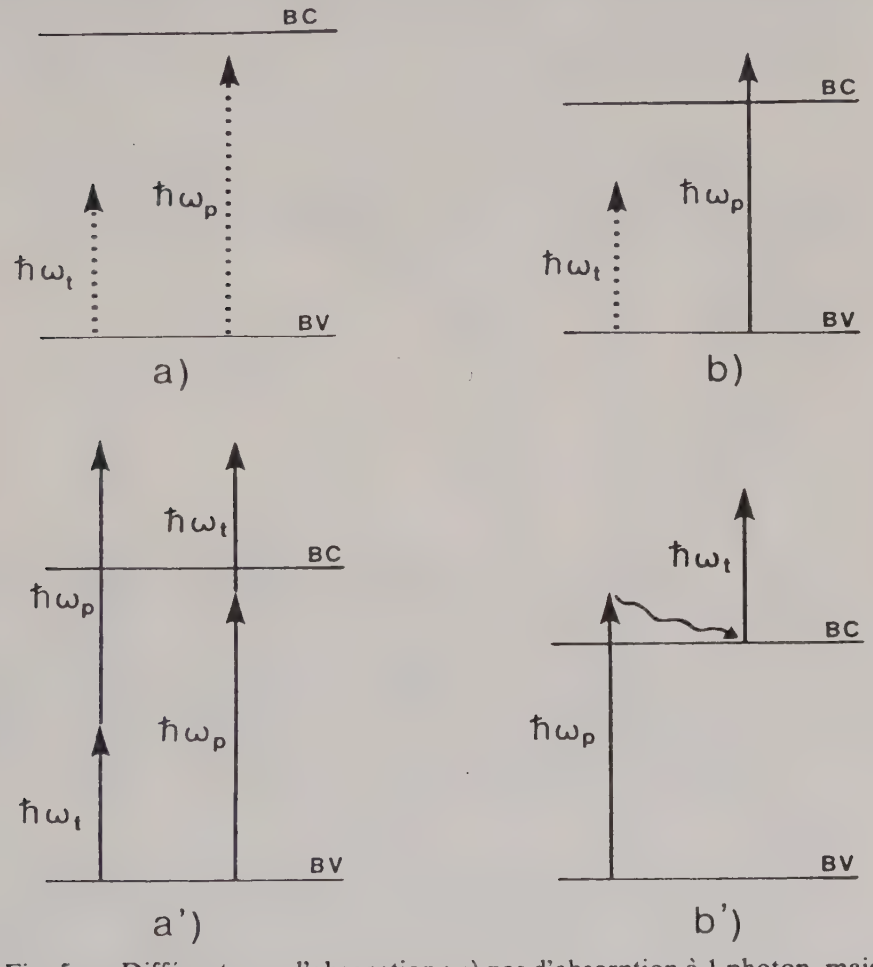


Fig. 5. — Différents cas d'absorption : *a*) pas d'absorption à 1 photon, mais possibilité de processus à 2 photons (*a'*); *b*) absorption à 1 photon du faisceau pompe, le faisceau test pouvant être absorbé à partir des états créés (*b'*).

pour les porteurs créés [11]. Par une expérience de type pompe et test, nous avons étudié l'absorption du faisceau test induite par le passage du faisceau de pompe dans la même région de l'échantillon. L'énergie par photon du test, $\hbar\omega_t$, est inférieure à celle du bord d'absorption du cristal; celle de la pompe $\hbar\omega_p$ peut être inférieure ou supérieure selon les cas (*fig.* 5 *a* et *b*). Les processus responsables de cette absorption induite peuvent être, soit une absorption à deux photons (un photon-pompe et un photon-test simultanés), soit une absorption en deux étapes. Dans le premier cas (*fig.* 5 *a'*), l'absorption n'a lieu que pendant la coïncidence temporelle des deux impulsions. Dans le deuxième cas (*fig.* 5 *b'*), un photon-pompe crée un exciton et un photon-test est absorbé à partir de cet état électronique; le taux d'absorption induite est alors proportionnel au nombre total de particules présentes dans le milieu.

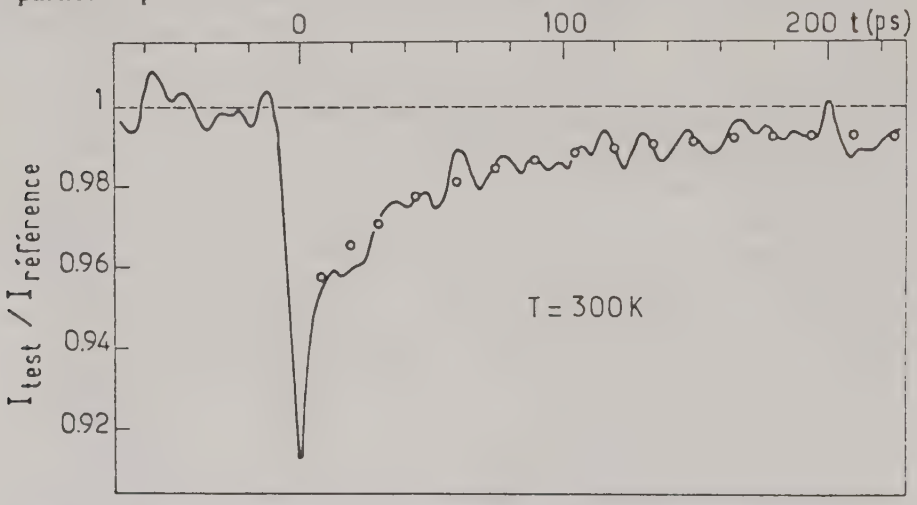


Fig. 6. — Transmission d'un échantillon de Cu_2O d'épaisseur 0,5 mm en fonction du retard entre le faisceau pompe et le faisceau test. Le pic d'absorption à $t = 0$ ps correspond à un processus instantanée à deux photons, le signal à $t \neq 0$ traduit l'évolution de la population d'ortho-excitons créés initialement. Les cercles représentent une décroissance théorique des excitons optiquement actifs par conversion ortho-para excitons ($\tau_1 = 35$ ps) et recombinaison radiative ($\tau_2 > 400$ ps).

Dans Cu_2O, nous avons étudié [12] l'évolution d'une population d'excitons créée à l'instant initial $t = 0$. Outre la relaxation globale de la population sur un temps relativement long (correspondant à ce qui a été déterminé par ailleurs en luminescence), nous avons observé, pour la première fois, le temps caractéristique de l'évolution d'une population d'excitons créés sous la forme *ortho*, vers un équilibre entre les formes *ortho* et *para*. Un temps de relaxation *ortho-para* de 35 ± 5 ps à $T = 300$ K a ainsi pu être mesuré (*fig.* 6).

Une étude d'absorption à deux photons ($\hbar\omega_t + \hbar\omega_p$) a été effectuée dans une région d'énergie $\hbar\omega_t < \hbar\omega_p < E_{absorption}$ (*fig. 5 a*). Cette étude a été réalisée en fonction de deux paramètres : la polarisation respective des deux faisceaux et la longueur d'onde du test. Le résultat le plus surprenant *a priori*, a été la mise en évidence, tant sur le plan théorique qu'expérimental, d'un phénomène de saturation de l'absorption à deux photons quand l'intensité de l'excitation augmentait. Il a aussi été démontré que cette absorption à deux photons (un photon d'excitation + un photon de mesure) apparaît à toutes les températures, même à celles (par exemple T = 300 K dans nos conditions expérimentales) où l'absorption à 1 photon est très importante. Ainsi, même dans le cas où l'on ne peut créer que des excitons par absorption dans la bande $n = 1$, on crée aussi une quantité non négligeable (jusqu'à 20 %) de porteurs libres à haute énergie dont on doit tenir compte dans toutes les interprétations des expériences.

2. Étude à l'échelle de la picoseconde de CuCl fortement excité

CuCl est un semi-conducteur à gap direct qui a déjà été largement étudié [13] à assez forte excitation, mais en utilisant des impulsions de durée

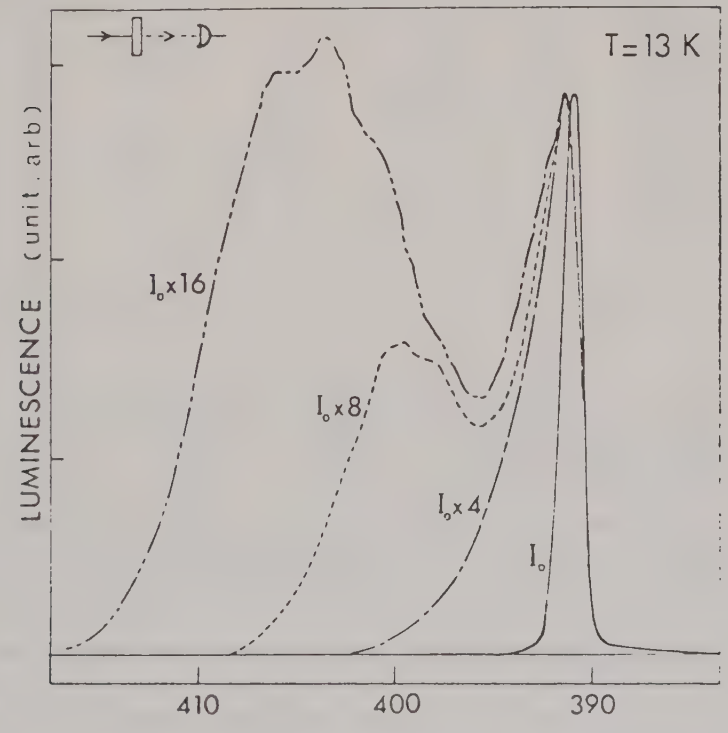


Fig. 7. — Luminescence intégrée dans le temps d'un film mince (50 nm) de CuCl pour différentes intensités d'excitation $n \times I_0$. Toutes les courbes sont normalisées au pic d'émission du biexciton (392 nm).

nanoseconde ou subnanoseconde. Cependant, la densité de paires d'électrons-trous créée était limitée par l'apparition de dommages irréversibles dans le cristal. En utilisant des impulsions de durée subpicoseconde, il est possible d'étendre la gamme des densités au delà de la limite de dissociation de Mott. De fait, il se produit une transition de phase dans l'état excité du système, entre une phase isolante composée de particules excitoniques et une phase conductrice consistant en un plasma superdense ($n > 10^{20}$ cm ^{3}). Bien que la formation d'un plasma d'électrons-trous ait déjà été observée dans plusieurs semiconducteurs à gap direct, en particulier l'AsGa [14], une étude dynamique de la transition de Mott n'y est pas facile car la température effective du plasma est comparable à l'énergie de liaison de l'exciton. Dans CuCl, cette énergie est très élevée, $E_x = 0{,}2$ eV, si bien que le critère $E_x/kT \gg 1$ y est plus aisément satisfait.

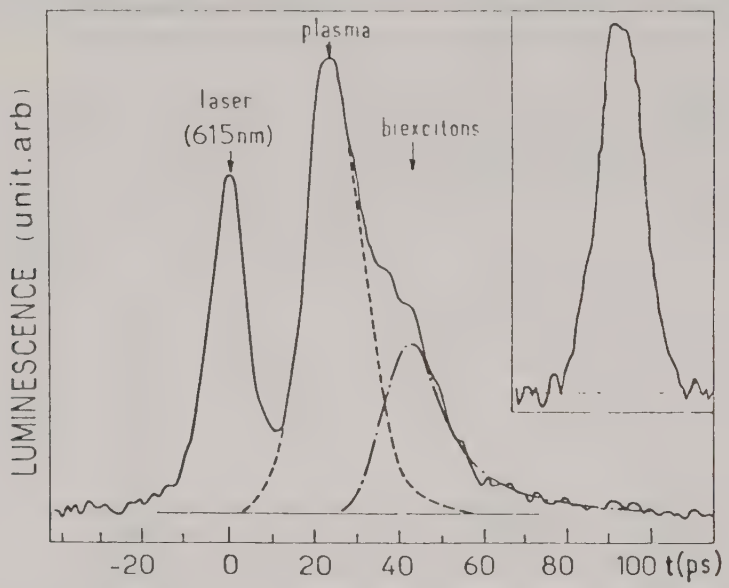


Fig. 8. — Évolution temporelle de la luminescence totale de CuCl enregistrée en un coup avec une caméra à balayage de fente. Le zéro de l'échelle des temps est placé arbitrairement à l'arrivée d'une petite partie de l'impulsion à 616 nm qui, doublée en fréquence, a excité le cristal. Le retard entre celle-ci et la luminescence est dû à la dispersion dans les éléments optiques. Le signal optique provenant du plasma uniquement est figuré dans l'encart avec la même échelle de temps.

Lorsqu'on excite le cristal avec une impulsion de durée 100 fs à 309 nm (énergie moyenne par impulsion : 10 μJ), on observe les spectres de luminescence intégrés dans le temps de la figure 7 [15]. La raie à 392 nm est bien connue et provient de la décomposition radiative de molécules excitoniques. La nouvelle large bande d'émission apparaissant à plus basse

énergie est caractéristique de la recombinaison d'une paire d'électron-trou à l'intérieur d'un plasma de densité variable : elle apparaît à partir d'un certain seuil d'excitation, sa largeur augmente avec l'intensité d'excitation, tandis que son bord basse énergie se déplace vers les grandes longueurs d'onde. Une estimation de la densité de porteurs dans le plasma calculée à partir de la position en énergie du gap renormalisé conduit à une valeur $N_c \sim 10^{19}$ cm $^{-3}$ pour l'apparition du plasma (transition de type Mott) en accord avec les estimations expérimentales.

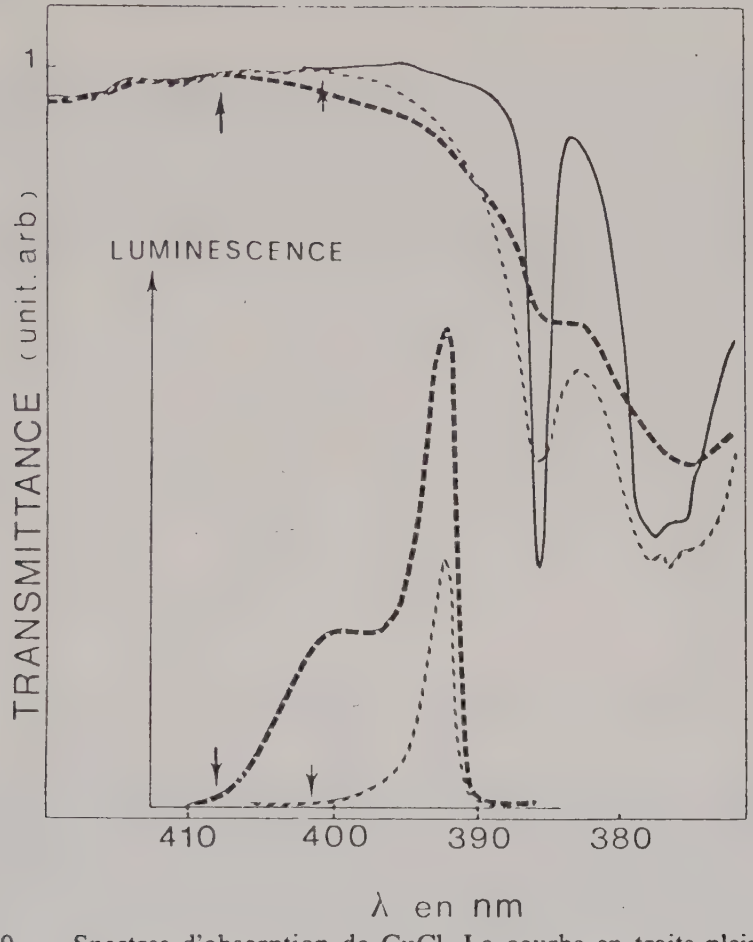


Fig. 9. — Spectres d'absorption de CuCl. La courbe en traits pleins est obtenue lorsque l'impulsion de test précède l'impulsion de pompe ($\Delta t < 0$) et est donc caractéristique du cristal non excité. Les excitons $n = 1$ des deux gandes de valence supérieures (Γ_7, Γ_8) et de la bande de conduction (Γ_6) sont à 387 et 378 nm. Les courbes en pointillés sont prises au même retard ($\Delta t = +1$ ps) pour deux intensités d'excitation différentes. Les spectres correspondants de luminescence intégrée dans le temps peuvent leur être comparées (bas de la figure).

Le déclin de l'émission du plasma a été mesuré à l'aide d'une caméra à balayage de fente (*fig.* 8). La durée du signal dû au plasma n'excède pas 10 ps. On observe également que la luminescence provenant du biexciton se produit après celle du plasma. Cela est en accord avec le modèle d'une forte population de paires d'électrons-trous créée avec $N > N_c$, donc non susceptible de former des excitons ou biexcitons; lorsque, après quelques picosecondes, la densité de ce plasma a décru jusqu'à N_c, les particules excitoniques sont créées et émettent avec retard par rapport au plasma.

Des informations concernant la dynamique du système excité peuvent être obtenues dans les expériences du type « pompe et test ». La figure 9 montre les résultats obtenus à 15 K sur un film suffisamment mince (900 Å) pour avoir une excitation à peu près homogène en volume. Pour des intensités d'excitation suffisantes, nous observons pour un retard $\Delta t = 1$ ps une disparition presque complète de la raie d'absorption excitonique qui correspond à l'écrantage des excitons par le plasma. Le rétablissement de la raie se fait en une dizaine de picosecondes, ce qui est en accord avec la

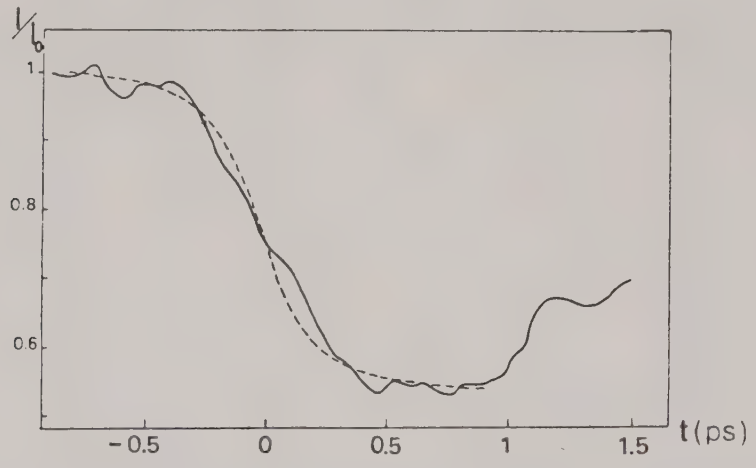


Fig. 10. — Absorption induite dans CuCl à 15 K pour $\lambda = 3\,905$ Å (région de transparence du cristal) : en traits pleins la courbe expérimentale, en pointillés la courbe théorique correspondant à une réponse instantanée avec impulsion d'une durée de 120 fs. Cette absorption induite correspond à l'établissement de la renormalisation de la bande d'énergie interdite.

durée du plasma. En même temps ($\Delta t = +1$ ps), apparaît une nouvelle bande d'absorption correspondant à la renormalisation du gap dont la position du bord basse énergie dépend de l'intensité d'excitation de la même manière que la luminescence. Lorsqu'on regarde à une longueur d'onde fixe l'établissement de cette nouvelle absorption (*fig.* 10), à l'échelle de notre résolution expérimentale (100 fs), elle suit l'arrivée de l'impulsion dans le cristal. A l'inverse, l'écrantage de l'exciton se produit avec un temps de

réponse de l'ordre de 300 fs. Ce dernier résultat pourrait provenir des dépendances différentes en N (la densité) et T (la température) de la renormalisation du gap et de l'écrantage des particules excitoniques.

PHOTOLYSE FEMTOSECONDE DES HÉMOPROTÉINES LIGANDÉES

L'analyse dynamique des produits de photolyse à l'échelle de la picoseconde a permis d'obtenir des informations sur les premiers stades du processus d'interaction hème-ligand dans la myoglobine et dans l'hémoglobine [16-19]. Dans une expérience préliminaire, Shank *et al.* [18] ont montré que la photolyse de HbCO se produit en moins de 0,5 ps.

Nous présentons ici des résultats d'expériences concernant les trajets de photolyse du CO et de l'oxygène ligandés à la myoglobine et l'hémoglobine, dans le domaine de 100 fs à 200 ps, en utilisant l'impulsion amplifiée d'un laser en anneau (*voir* p. 3). Nous avons observé que la photodissociation des espèces ligandées se produit avec une constante de temps de 250 à 300 fs avec dans les 200 ps suivantes des évolutions spectrales différentes selon que le ligand est CO ou O_2. Un processus de restauration en deux étapes, comprenant la relaxation d'une espèce ligandée et une recombinaison géminée, n'apparaît que dans les espèces ligandées avec l'oxygène. Ces résultats fournissent une explication plausible de la grande différence de rendement quantique de photodissociations entre les espèces ligandées au CO et celles qui le sont à O_2.

Les solutions d'hémoglobine purifiée sont préparées à partir de sang frais humain sur une colonne de chromatographie Sephadex DEAE, dilué dans 0,05 M bis Tris ou dans un tampon phosphaté 0,1 M, à pH 7 ou 8 et à température ambiante. La myoglobine, sperm whale type II (SW) ou horse heart type III (HH) de Sigma, est préparée suivant le procédé de Rothgeb et Gurd [20]. Les dilutions de la solution-mère sont faites pour obtenir une absorbance de 2,2 au maximum de la bande de Soret après saturation avec CO ou O_2. Ces solutions sont introduites dans des cuves de silice d'épaisseur 0,1 ou 0,05 cm, déplacées horizontalement, de façon que chaque impulsion excite à 10 Hz une région différente de l'échantillon.

Hémoprotéines ligandées avec CO

Dans HbCO, la montée du « blanchiment » à 419 nm (*fig.* 11) correspondant à la disparition de l'absorption fondamentale de l'espèce ligandée se produit pendant la durée de l'impulsion (réponse instantanée). Par contre, et en prenant en compte le retard variable dû à la dispersion du

faisceau continuum dans les divers éléments optiques, l'absorption induite à 433 nm ne peut être reproduite par une courbe de réponse instantanée. Le meilleur accord pour le taux d'apparition de l'espèce deoxy Hb est obtenu avec $\tau_{Hb} = 300$ fs (*fig.* 11). On trouve que cette valeur est indépendante du pH, de la force ionique et de la concentration en CO entre 0,01 et 1 atm. Des résultats semblables sont obtenus avec des solutions de MbCO HH ou SW.

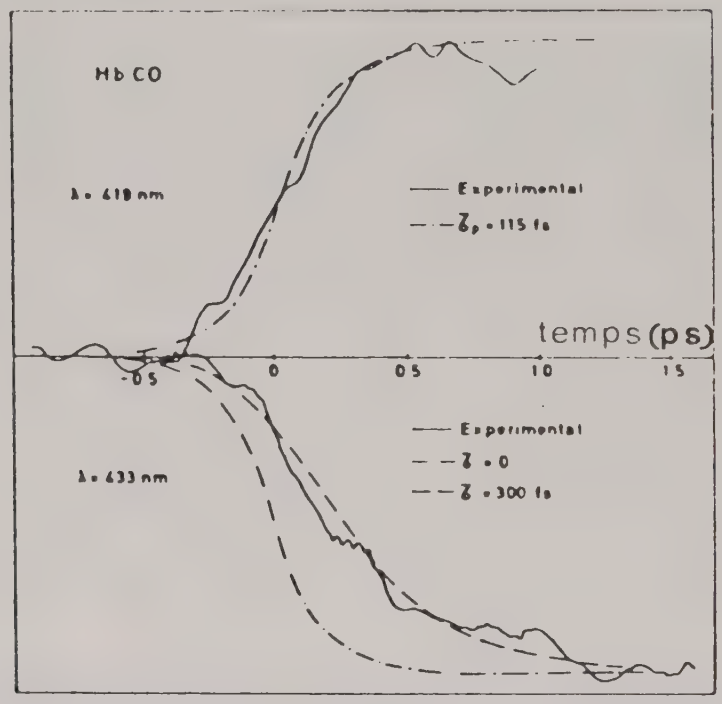


Fig. 11. — HbCO : Cinétique du blanchiment à 419 nm et de l'apparition de l'espèce deoxy à 433 nm. Le trait mixte dans la partie supérieure de la figure correspond à la réponse instantanée calculée pour une durée d'impulsion $\tau_p = 115$ fs. Le trait mixte et le trait tireté correspondent respectivement aux réponses exponentielles $\tau = 0$ et $\tau = 300$ fs.

La figure 12 représente le spectre différentiel : Mb-MbCO enregistré 5 et 50 ps après l'excitation d'un échantillon de MbCO. Aucune autre variation du spectre des ΔA n'a été observée jusqu'à 200 ps après l'excitation. On peut noter aussi que les formes du spectre transitoire sont semblables à celles du spectre différentiel (ΔA) statique sans élargissement de la bande de Soret de Mb deoxy.

A partir de ces résultats, il peut être proposé un schéma simple des processus de photolyse dans les hémoprotéines ligandées avec CO. Ces

trajets impliquent la formation d'une espèce excitée (XCO*) fortement dissociative et qui relaxe, d'une part pour 50%, directement vers l'état fondamental de l'espèce ligandée ($\tau = 300$ fs) et d'autre part vers un ou plusieurs états ligandés et non dissociatifs. Aucun processus de recombinaison n'a été observé dans les 200 ps qui suivent l'excitation.

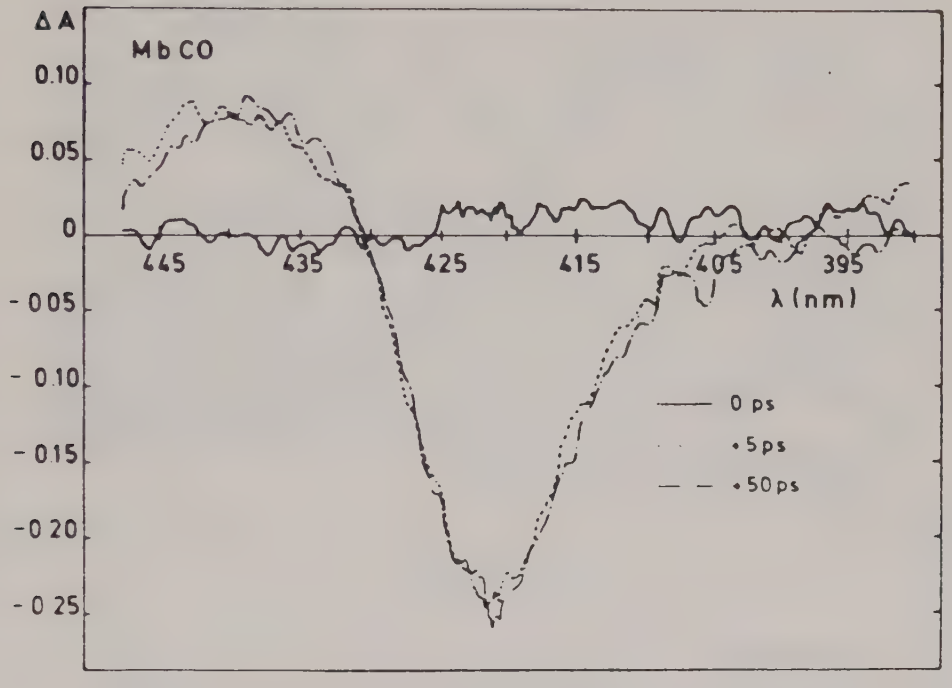


Fig. 12. — MbCO : spectre différentiel transitoire de deoxy Mb *moins* MbCO à différents temps après l'excitation femtoseconde à 309 nm.

Hémoprotéines ligandées avec O_2

Les cinétiques rapides de photodissociation dans HbO_2 (*fig.* 13) sont semblables à celles observées dans les solutions de HbCO ou de MbCO. La constante de temps correspondant à l'apparition de l'espèce deoxy à 431,5 nm est de 250 ± 20 fs. Des valeurs identiques sont mesurées dans des solutions de MbO_2. Le spectre initial des ΔA, entièrement développé et correspondant à un temps de 1 à 4 ps après l'excitation, est montré figure 4 (spectre 4 ps). Ce spectre fait apparaître la formation d'une espèce Mb déligandée avec, comparé au spectre de Mb stable, une bande d'absorption plus large s'étendant jusqu'à 470 nm. Cette espèce transitoire excitée relaxe entièrement vers le produit Mb stable dans les 5 ps qui suivent l'excitation

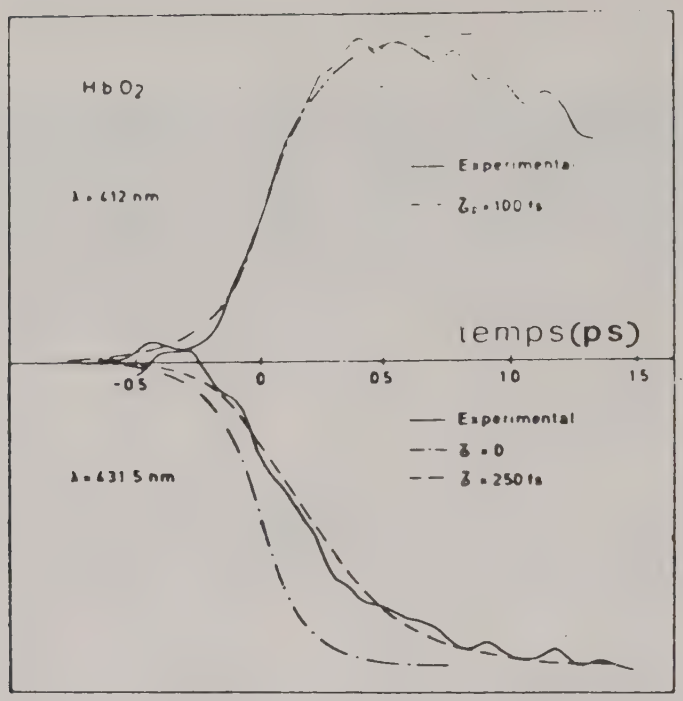


Fig. 13. — HbO_2 : Cinétique du blanchiment à 412 nm et de l'apparition de l'espèce deoxy à 431,5 nm. Transmission induite normalisée (haut de la figure) et absorption induite (bas).

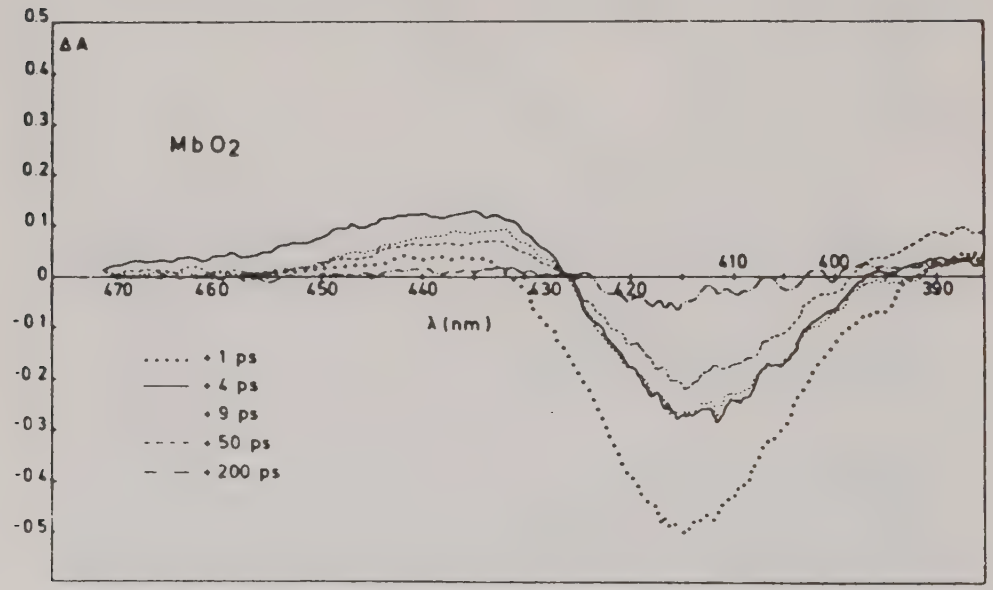


Fig. 14. — MbO_2 : Spectres différentiels après photodissociation de MbO_2. Remarquer la large bande déportée vers le rouge apparaissant à +4 ps qui relaxe vers celle d'une espèce stable Mb, ainsi que les variations symétriques se produisant dans le spectre après cette relaxation initiale.

(spectre + 9 ps de la figure 14). La constante de temps du déclin de cette espèce excitée est 1,4 ps, ce qui a été mesuré par la cinétique des variations sur, ou au voisinage du point isobestique (424,5 nm). Comme on peut le remarquer sur la figure 14, aucune autre variation de la forme des spectres de ΔA n'est observée après cette relaxation. On observe cependant, dans les 200 ps qui suivent cette relaxation, une restauration simultanée du blanchiment à 414 nm et de l'absorption induite à 438 nm.

En conclusion, ces résultats démontrent que la photodissociation des hémoprotéines ligandées avec CO ou O_2 a lieu en passant par un état excité de très courte durée de vie et qui relaxe ($\tau = 250$ à 300 fs) en une espèce déligandée [21, 22]. La présence du ligand O_2 induit un état excité déligandé, ce qui est indiqué, dans le spectre des ΔA, par la bande déplacée vers le rouge. Nos résultats démontrent aussi qu'une phase de recombinaison géminée succède aux relaxations initiales. Ces résultats donnent de nouvelles informations dans les trajets de photodissociation et impliquent que le faible rendement quantique de dissociation des hémoprotéines ligandées avec O_2 est principalement dû à la relaxation des états excités vers des états non dissociatifs, et aussi à la recombinaison géminée des molécules O_2 [22].

BIBLIOGRAPHIE

[1] R. K. JAIN et J. P. HERITAGE, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 32, p. 41, 1978.

[2] G. MOUROU et J. SIZER, *Opt. Comm.*, vol. 41, p. 47, 1982.

[3] E. P. IPPEN et C. V. SHANK, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 27, p. 488, 1975.

[4] A. MIGUS, J. L. MARTIN, R. ASTIER, A. ANTONETTI et A. ORSZAG, 3e *Conférence internationale Picosecond phenomena*, Garmisch, 1982, Femtosecond optical pulses: towards tunability at the gigawatt level.

[5] A. ANTONETTI, R. ASTIER, G. GRILLON, D. HULIN, J. L. MARTIN et A. MIGUS, CLEO'82, Phoenix, 1982; Generation of gigawatt broadly tunable optical subpicosecond pulses.

[6] C. V. SHANK et E. P. IPPEN, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 24, p. 373-375, 1977.

[7] A. MIGUS, C. V. SHANK, E. P. IPPEN et R. L. FORK, *I.E.E.E. J. Quant. Electr.*, vol. 18, p. 101, 1982.

[8] A. MIGUS, J. L. MARTIN, R. ASTIER et A. ORSZAG, in *Picosecond phenomena II*, Springer Verlag, p. 59-63, 1980.

[9] R. L. FORK, B. I. GREENE et C. V. SHANK, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 38, p. 671, 1981.

[10] R. L. FORK, C. V. SHANK et R. T. YEN (to be published in *Appl. Phys. Lett.*).

[11] F. I. KRIENGOLD et V. L. MAKAROV, *Sov. Phys. Sol. State*, vol. 15, p. 890, 1973.

[12] A. ANTONETTI, R. ASTIER, J. L. MARTIN, A. MIGUS, D. HULIN et A. MYSYROWICZ, *Optics Comm.*, vol. 38, p. 431, 1981.

[13] *Voir* par exemple E. HANAMURA et H. HANG, *Physics*, vol. 33*c*, p. 209, 1977.

[14] S. TANAKA, H. KOBAYASHI, H. SAITO et S. SHIONOYA, *J. Phys. Soc. Jap.*, vol. 49, p. 1051, 1980; E. O. GOBEL, P. H. LIANG et D. VON DER LINDE, *Sol. St. Comm.*, vol. 37, p. 609, 1981.

[15] D. HULIN, A. ANTONETTI, L. L. CHASE, J. L. MARTIN, A. MIGUS et A. MYSYROWICZ, *Optics Comm.*, vol. 42, p. 260, 1982.

[16] B. I. GREENE, R. M. HOCHSTRASSER, R. B. WEISMAN et W. A. EATON, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, vol. 75, p. 5255, 1978.

[17] L. J. NOE, W. G. EISERT et P. M. RENTZEPIS, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, vol. 75, p. 573, 1978.

[18] C. V. SHANK, E. P. IPPEN et R. BERSOHN, *Science*, vol. 198, p. 50-51, 1976.

[19] P. A. CORNELIUS, A. W. STEELE, D. A. CHERNOFF et R. M. HOCHSTRASSER, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, vol. 78, p. 7526, 1981.

[20] T. M. ROTHGEB et F. R. N. GURD, *Methods in Enzymol.*, vol. 52, p. 473, 1978.

[21] J. L. MARTIN, A. MIGUS, C. POYART, Y. LECARPENTIER, R. ASTIER et A. ANTONETTI, *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, vol. 80 January 83.

[22] J. L. MARTIN, A. MIGUS, C. POYART, Y. LECARPENTIER, A. ANTONETTI et A. ORSZAG, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol. 107, n° 3, p. 803, 1982.

RESUME

L'objet du présent travail est de déterminer, par une discrimination temporelle des évènements, la nature des altérations électroniques et structurales de l'hème, consécutives à la dissociation de la liaison hème-ligand. Les cinétiques de photodissociation de deux hémoprotéines - la myoglobine et l'hémoglobine - ligandées avec une molécule d'oxyde de carbone, d'oxygène ou d'oxyde azotique ont été analysées. Nous avons d'autre part estimé l'influence de l'environnement protéique, en analysant la nature des espèces transitoires après photodissociation du protohème CO. Une des contributions de ce travail est d'avoir étendu au domaine femtoseconde l'analyse dynamique de l'intéraction hème-ligand qui était jusqu'ici limitée par une résolution d'environ 10 ps. Nous avons ainsi démontré que l'espèce déligandée apparait avec une constante de temps de 300 Fs $\pm$ 50 Fs et possède un maximum d'absorption déplacé vers les grandes longueurs d'onde de + 4 nm ($\pm$ 0.5 nm) pour les hémoprotéines. L'analyse des spectres transitoires a, par ailleurs, permis de caractériser la nature des espèces excitées à courte durée de vie. Une phase de recombinaison géminée de la molécule d'oxygène et d'oxyde azotique a été mise en évidence. La nitrosylhémoglobine se distingue de l'oxyhémoglobine, par la présence d'une double phase de recombinaison géminée (τ=12 ps et $\tau \simeq$ 120 ps.

Mots clé :
- Dynamique moléculaire
- Hémoprotéines
- Photodissociation
- Spectroscopie femtoseconde.